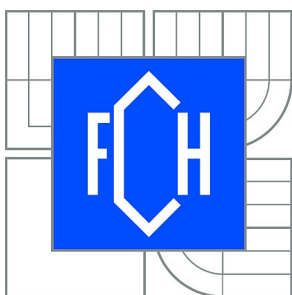


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY

MATERIALS RESEARCH CENTRE

KALORIMETRICKÁ STUDIE INTERAKCÍ HUMINOVÝCH LÁTEK S KOVOVÝMI IONTY

CALORIMETRIC STUDY OF INTERACTIONS OF HUMIC SUBSTANCES WITH METAL IONS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. IRENA TÜRKEOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. MARTINA KLUČÁKOVÁ,
Ph.D.

BRNO 2013



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0727/2012	Akademický rok: 2012/2013
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	Bc. Irena Türkeová	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Jitka Krouská, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Kalorimetrická studie interakcí huminových látek s kovovými ionty

Zadání diplomové práce:

- 1) literární rešerše - reaktivita huminových látek, využití modelových sloučenin
- 2) plán experimentů
- 3) vlastní experimentální měření
- 4) zpracování výsledků a závěr

Termín odevzdání diplomové práce: 3.5.2013

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Irena Türkeová
Student(ka)

doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Hlavní náplní této diplomové práce bylo prostudovat interakce huminových látek s vybranými kovovými ionty pomocí titrační kalorimetrie. Byla provedena rešerše o reaktivitě huminových látek a využití modelových sloučenin při výzkumu v této oblasti, jako nástroje k snadnějšímu pochopení struktury, vlastností a vazebných možností huminových látek. K charakterizaci studovaných huminových kyselin byly použity metody elementární analýzy, FT-IR spektrometrie, potenciometrické a konduktometrické titrace, kterými byly získány kyselosti huminových kyselin - celková kyselost a karboxylátová kyselost. Byla optimalizována metoda isothermické titrační kalorimetrie k využití při studiu reaktivity huminových kyselin, tato optimalizace byla nejlépe aplikovatelná na soli huminových kyselin. Jako modely hlavních vazebných míst huminových kyselin byly vybrány jednoduché organické sloučeniny- kyselina benzoová, kyselina ftalová, kyselina salicylová, pyrokatechol a fenol. Z výsledků titrací byly vypočítány hodnoty reakční entalpie. Výsledky entalpií z titrací modelů byly porovnány se semiepirickými kvantově chemickými výpočty podle INDO metody.

ABSTRACT

The main object of the diploma thesis is study of interaction between humic acids and selected metal ions using calorimetric titration. The research about reactivity of humic substances is done comparing the different models used to describe the variety of properties of humic substances. In experimental part the methods of FT-IR spektrometry, potentiometric and conductometric titration are used to receive the total acidity and carboxylic acidity of lignite humic acid. The optimalization of isothermic titration calorimetry is done to be used within study of reactivity of humic acids, revealing the best correlation with sols of studied humic acid. The basic organic compounds were used including benzoic acid, fthalic acid, salycilic acid, pyrocatechol and phenol as models of bonding groups in humic acids. The reaction enthalpy was calculated from the titration of models and results were compared with semiempiric quantum chemistry calculations following INDO method.

KLÍČOVÁ SLOVA:

huminové látky, huminové kyseliny, isothermická titrační kalorimetrie, přechodné prvky, měď

KEY WORDS:

humic substances, humic acids, isothermal titration calorimetry, transition elements, copper

TÜRKEOVÁ, I. *Kalorimetrická studie interakcí huminových látek s kovovými ionty*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 57 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. Ing. Martině Klučákové, Ph.D. za vynikající vedení, cenné rady a především za energii a čas, který mi při vypracování diplomové práce věnovala. Ráda bych také poděkovala Ing. Jitce Krouské, Ph.D. za předání cenných zkušeností při osvojování experimentální techniky, za energii a čas, který mi věnovala.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během celého studia na vysoké škole.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	CÍL PRÁCE	8
3	TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1	Huminové látky	9
3.2	Huminové kyseliny	11
3.2.1	Vznik a výskyt huminových kyselin	11
3.2.2	Vlastnosti a struktura huminových kyselin	12
3.2.3	Funkční skupiny	13
3.2.4	Vazebné možnosti huminových kyselin	13
3.2.5	Stanovení entalpie pomocí kalorimetrie	16
3.3	Metody charakterizace huminových kyselin	17
3.3.1	FT-IR spektrometrie	17
3.3.2	Potenciometrická a konduktometrická titrace	18
3.3.3	Izotermická titrační mikrokolorimetrie	18
4	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	20
4.1	Využití modelů při studiích huminových kyselin, reaktivita HK	20
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
5.1	Použité chemikálie	23
5.2	Použité přístroje a zařízení	23
5.3	Příprava vzorků a odměrných roztoků	23
5.3.1	Příprava huminových kyselin	23
5.3.2	Příprava odměrných roztoků	24
5.3.3	Příprava odměrných (titračních) roztoků	24
5.4	Postup práce	24
5.4.1	Charakterizace huminových kyselin	24
5.4.2	Optimalizace metody měření na mikrokolorimetru TAM III	26
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	34
6.1	Charakterizace huminových kyselin	34
6.2	Optimalizace metody měření na mikrokolorimetru TAM III	38
6.3	Optimalizovaný postup aplikovaný na soly HK	44

6.4	Optimalizovaný postup aplikovaný na modely HK.....	48
7	ZÁVĚR.....	52
8	LITERATURA.....	53
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	56
10	SEZNAM PŘÍLOH.....	57

1 ÚVOD

Huminové kyseliny jsou přírodní látky, jsou jednou ze tří frakcí huminových látek, rozpustné v alkáliích. Huminové kyseliny jsou považovány za komplexní aromatické makromolekuly. Struktura huminových kyselin je značně variabilní, liší se původem, nalezištěm i způsobem odběru vzorku. Zájem o huminové kyseliny je především díky velkému množství nenahraditelných funkcí v přírodě a značnému využití v medicíně, agrochemii, stavebnictví.

Dokážou zadržet vodu v půdě, podílí se na transportu živin rostlinou, jsou regulátory mnoha chemických a biochemických procesů. Jednou z dalších vlastností je jejich pufrací schopnost v širokém rozsahu hodnot pH. Jsou schopny interakce s širokým spektrem látek, jako jsou kovy, organické a anorganické polutanty v půdě. Tato schopnost je velice významná při znečištění půd, proto se ve velké míře provádí výzkum na objasnění interakcí huminových látek s okolím a již mnoho let se vědci snaží detailně charakterizovat samotnou strukturu huminových látek.

K charakterizaci studovaných huminových kyselin byly vybrány tyto metody: elementární strukturní analýza, potenciometrické a konduktometrické titrace, FT-IR spektrometrie.

Ke studiu interakcí mezi huminovými kyselinami a přechodnými kovy byla zvolena metoda isotermické titrační kalorimetrie. Cílem práce bylo ověřit možnosti této metody při studiu huminových kyselin a optimalizovat postup měření při použití těchto složitých systémů. Stejným způsobem byly prozkoumány jednoduché organické sloučeniny, jakožto modely vazebných míst, které se interakcí s kovy účastní a jsou za ně odpovědné. Jako modely byly vybrány: kyselina ftalová, kyselina benzoová, kyselina salicylová, fenol a pyrokatechol.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo posoudit možnosti využití isotermické titrační kalorimetrie v huminovém výzkumu, především jako možný nástroj ke studiu vzájemných interakcí huminových látek s přechodnými kovy. Optimalizovat postup měření a využít při studii jednoduché organické sloučeniny, které modelují hlavní vazebná místa, která se interakcí s kovy účastní.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Huminové látky

Huminové látky (HL) jsou přírodní látky, které patří mezi vysokomolekulární, převážně cyklické sloučeniny aromatického charakteru. Liší se podle složení primárních organických látek a podle biologických podmínek v půdě. Prekurzorem huminových látek je např. gallová kyselina a tannin, které vznikají při tlení listů a dřeva. Tvoří základní organickou část část půdy. Nejvíce se huminové látky vyskytují v půdě a kaustobiolitech, což jsou hořlavé sedimenty organogenního charakteru (např. ropa, hnědé uhlí, černé uhlí, lignit, rašelina). HL se dále vyskytují v dnových sedimentech, odkud jejich rozpustné podíly přecházejí do povrchových vod. Dá se říci, že jsou všude přítomné v životním prostředí. [1, 2, 3]

Huminové látky představují širokou paletu různých sloučenin, na jejichž tvorbě se podílí organické sloučeniny, jako jsou sacharidy, pektiny, lignin, bílkoviny, tuky, vosky, živice, třísloviny a jiné. Vznikají biologickou a chemickou humifikací živé hmoty, což je proces přeměny organických látek. Při humifikaci je potřeba zdůraznit především probíhající děje polymerizačních a kondenzačních reakcí produktů rozkladu primární organické hmoty na produkty, jež jsou výsledkem tzv. humifikačního procesu. [4]

Huminové látky se nejčastěji dělí do tří hlavních frakcí, a to podle rozpustnosti:

- Huminové kyseliny
- Fulvinové kyseliny
- Huminy

Vznik a rozdělení organické hmoty je podrobně znázorněn na Obr. 1. [2, 5]



Obr. 1 Vznik a rozdělení organické hmoty

- *Huminové kyseliny* jsou rozpustné v roztocích alkalického původu, ale nerozpustné v kyselém prostředí ($\text{pH} < 2$). Nerozpustnými v kyselém prostředí se stávají kvůli protonaci karboxylovou schopnost.
- *Fulvinové kyseliny* jsou rozpustné v alkalickém a kyselém prostředí
- *Huminy* nejsou rozpustné ve vodných roztocích. Jsou nezávislé na pH roztoku.

Výše uvedené rozdělení podle rozpustnosti jednotlivých frakcí huminových látek bylo klasifikováno panem Berzelieusem (1839). Toto rozdělení bylo rozšířeno panem Mulderem o vlastnosti, které navíc popisují barevnost jednotlivých frakcí a rozpustnost v daných rozpouštědlech.

Huminové látky mají podobnou chemickou strukturu, ale liší se chemickými a fyzikálními vlastnostmi. Obrázek č. zobrazuje vlastnosti frakcí huminových látek.

Huminové látky				
fulvinové kyseliny		huminové kyseliny		huminy
2 000		nárůst molekulové hmotnosti		30 000
45 %		nárůst obsahu uhlíku		62 %
48 %		pokles obsahu kyslíku		30 %
		pokles kyselosti		
		pokles stupně rozpustnosti		

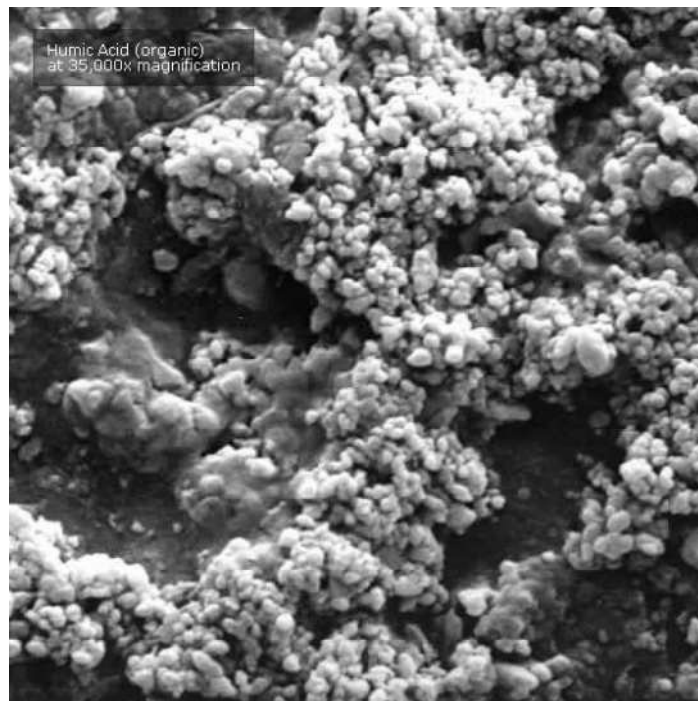
Obr. 2 Vlastnosti a rozdělení huminových látek [2]

FK a HK se liší v mnoha směrech. Fulvinové kyseliny mají nižší molekulové hmotnosti než huminové kyseliny. Naopak ale mají větší obsah kyslíku, což je zaručeno tím, že obsahují více funkčních skupin, především karboxylových, fenolických a karbonylových, než huminové kyseliny. Tato skutečnost poukazuje na větší rozpustnost FK ve vodných roztocích při všech pH než je tomu u HK. FK jsou méně aromatické. Jednotlivé frakce se mění zbarvením, nerozpustné huminy jsou čern, více rozpustné jsou šedé a hnědé huminové kyseliny, nejvíce rozpustné jsou fulvinové kyseliny a ty mají barvu žlutou. [2]

Huminové látky plní v půdě řadu funkcí, převážně zásobovací, akumulární, regulační a ochrannou. Proto je snahou získat huminový preparát, který by měl podobné vlastnosti a tímto způsobem vylepšil půdní podmínky.[5]

3.2 Huminové kyseliny

Huminové kyseliny (HK) jsou všudypřítomné přirozeně se vyskytující polymery, které jsou důležitými prekurzory kerogenů, živice, ropy a uhlí. Jsou považovány za nejúčinnější složku humusu.



Obr. 3 Huminová kyselina při 3500 x zvětšení[2]

3.2.1 Vznik a výskyt huminových kyselin

Huminové kyseliny vznikají při rozpadu rostlinných a živočišných zbytků za přítomnosti vlhkosti procesem humifikace. Dosud nebyla vyvinuta zcela uspokojivá teorie, která by byla schopna popsat vznik huminových a fulvinových kyselin v různých prostředích. Mezi hypotézy vzniku huminových látek patří

1. Polyfenolová teorie - mnoho let se předpokládalo, že huminové látky jsou odvozeny od ligninu. Zbytky ligninu se hromadí ve zbytcích rostlinného materiálu, za postupné ztráty methoxylových skupin ($-\text{OCH}_3$), která je spojena s tvorbou o -hydroxyfenolů a oxidací alifatických postraních řetězců za vzniku karboxylových skupin ($-\text{COOH}$). Předpokládá se, že lignin při oxidaci reaguje s amoniakem, za vzniku kondenzačních produktů. Při tomto procesu se dusík stává součástí cyklických forem.
2. Ligninová teorie - popisuje dva způsoby vzniku HL. V prvním z nich, hraje lignin stále důležitou roli. V tomto případě fenolické aldehydy a kyseliny uvolněné z ligninu působením mikroorganismů projdou enzymatickou přeměnou na chinony, které polymerizují na makromolekuly huminové povahy. Druhý způsob je podobný předchozímu kromě toho, že polyfenoly jsou syntetizovány mikroorganismy z jiných zdrojů uhlíku, než ligninových. Polyfenoly jsou poté enzymaticky oxidovány na chinony a přeměněny na huminové látky.

3. Teorie kondenzace cukrů s aminy - tato teorie, že humus vzniká z cukrů, se datuje k počátečním výzkumům huminových látek. Huminové látky vznikají kondenzací aminosloučenin s redukujícími cukry. Redukující cukry a aminy neenzymaticky polymerizují na dusíkaté polymery. Tato reakce probíhá za běžných podmínek pomalu. Předpokladem této teorie je, že reaktanty pro tvorbu huminových látek jsou produkty metabolismu mikroorganismů, které vznikají v hojném počtu. [6]

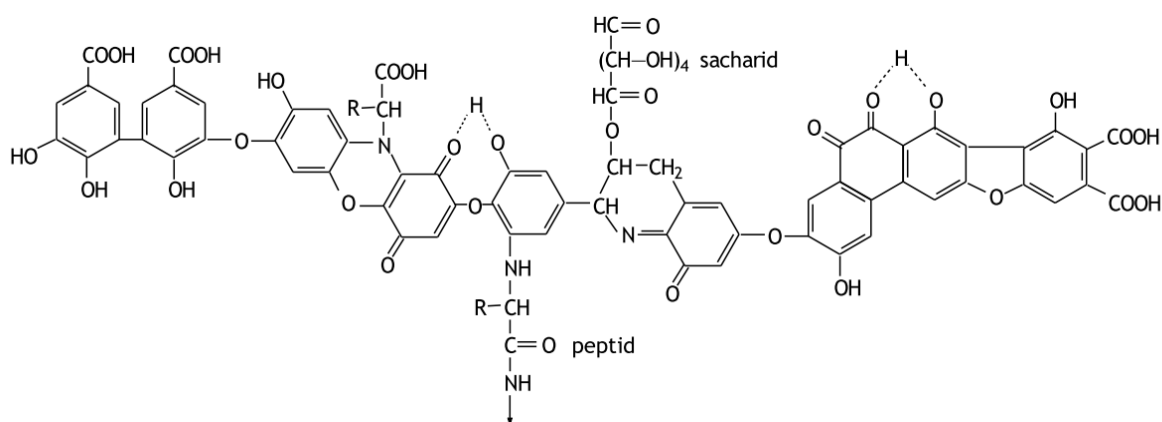
Huminové kyseliny se vyskytují na mnoha místech v přírodě. Jsou ve všech typech půdy, sedimentech, rašelině, uhlí, řekách. Byly extrahovány z rostliny *Pilayella littoralis*, to bylo poprvé, kdy bylo navrženo, že HK nevznikají jen neregulovatelnými mikrobiálními rozklady. Dále bylo prokázáno, že HK se vyskytují v gastro-intestinálním traktu lidí a zvířat. Jsou absorbovány zvířaty, cirkulují v jejich krevním oběhu a jsou metabolizovány v játrech. [7]

3.2.2 Vlastnosti a struktura huminových kyselin

Huminové kyseliny jsou schopny interakce s širokou škálou látek, jako jsou kovy, organické a anorganické polutanty v půdách a vodách. Další velmi významnou vlastností huminových kyselin přítomných v půdě je jejich vysoká pufrací schopnost v širokém rozsahu hodnot pH. Toto je způsobeno především disociací kyselých funkčních skupin, na které jsou huminové kyseliny bohaté. [8]

Struktura huminových kyselin je značně rozdílná, liší se původem, nalezištěm, ale záleží také na odběru vzorku, protože huminové kyseliny se chovají jako živý organismus a za vhodných podmínek mění svou strukturu. Tento proces je důležitou součástí půdotvorných procesů.

Všechny typy huminových kyselin obsahují prvky C, H, O, N, S a P. Huminové kyseliny jsou všeobecně považovány za komplexní aromatické makromolekuly, ve kterých spojení mezi aromatickými skupinami zajišťují aminokyseliny, aminocukry, peptidy a alifatické sloučeniny. Hypotetická struktura huminové kyseliny obsahuje volné a vázané fenolické skupiny -OH, chinonové struktury, dusíkové a kyslíkové atomy ve funkci můstků a karboxylové skupiny umístěné na aromatických kruzích. [6]



Obr. 4 Struktura molekuly huminové kyseliny podle Stevensona (1984) [6]

3.2.3 Funkční skupiny

Huminové kyseliny jsou v podstatě soustava velkých polyfunkčních skupin, jako jsou lipidy, uhlovodíky, aromatické sloučeniny a další. Vyplývá tedy, že se výrazně liší obsah funkčních skupin u huminových kyselin podle jejich původu a vzniku. Přítomné funkční skupiny jsou zodpovědné za jejich reaktivitu a je velmi důležité určit jejich obsah a rozložení uvnitř kyselin. Reakčními místy jsou ve struktuře huminových především místa schopná ionizace. Tato místa obsahují atomy kyslíku, dusíku a síry formující karboxylové, fenolové, hydroxylové, aminové a thiolové funkční skupiny. Kyselé vlastnosti huminových kyselin jsou přiřazovány karboxylovým a fenolickým funkčním skupinám. Tyto skupiny jsou zároveň mezi hlavními funkčními skupinami způsobujícími interakce huminových kyselin s okolními látkami. Fenolických skupin obsahují huminové kyseliny obvykle méně než skupin karboxylových, přičemž se těmto skupinám přisuzuje menší kyselost než skupinám karboxylovým. [9]

3.2.4 Vazebné možnosti huminových kyselin

Z hlediska častého využití huminových látek v ochraně životního prostředí, např. v sanačních technologiích, je důležité znát vazebné interakce látek s kontaminujícími látkami, polutanty, těžkými kovy, které se vyskytují v prostředí. Z prozkoumaných vlastností huminových látek a ze známých informací o struktuře dokážeme přibližně odvodit možné vazebné interakce. Díky dostupným informacím v této oblasti můžeme předpokládat některé typy vazebných interakcí. Mezi typy vazeb patří: [10]

Iontová vazba

Vazba vychází ze vzájemného působení elektrostatických sil mezi pevnými náboji přítomných funkčních skupin a ionty v roztoku. Tato vazba je předpokládána u reakcí s alkalickými kovy, amoniakem.

Koordinační vazba

Tento typ vazby představuje nejdůležitější typ interakce HL s ionty kovů. Vznik této vazby je pravděpodobně způsoben velkým zastoupením karboxylových, fenolických a dalších funkčních skupin ve struktuře HL. Nejvíce se u huminových látek této vazby podílí karboxylové a fenolické funkční skupiny. Disociaci skupin je možno ovlivnit hodnotou pH prostředí. Ve slabě kyselém prostředí se na vzniku vazby podílí karboxylové skupiny, naopak při pH nad 7 se na vazbě začínají podílet skupiny fenolické. Obecným rysem vznikajících komplexů je fakt, že s rostoucím pH roste jejich stabilita.

Vodíkové můstky

Z hlediska, že přesná struktura huminových látek není dostatečně známá, dají se předpokládat vazebné interakce typu vodíkových můstků, z hlediska přítomnosti některých funkčních skupin (amidová, laktámová, nitrilová). Tyto vazby se i přes nízký energetický obsah můžou podílet na vazebných schopnostech huminových látek.

Hydrofobní interakce

Tyto interakce vznikají při styku nepolárních skupin (např. alkylových) nesených molekulami, které se nacházejí ve vodných roztocích, kde tyto interakce mohou vycházet

např. působením Van der Waalsových sil nebo přesunu π -elektronů. Tyto interakce jsou nejčastější předpokládanou vaznou interakcí mezi HL s hydrofobními alifatickými kontaminanty.

Rozsáhlé studie poukazují na fakt, že pouze málo HL se vyskytuje v půdě ve volné formě, ale mnoho jich je vázaných na jíl nebo na jiné minerální složky půdy. Interakcí HL se sloučeninami v půdě, vznikají:[2]

Soli nízkomolekulárních organických kyselin

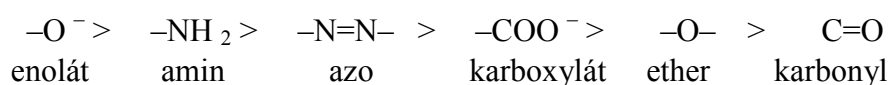
Vznikají reakcemi organických kyselin (octová, šťavelová, fumarová a mléčná kyselina) s minerály (magnezit, kalcit, siderit) nebo solemi minerálních kyselin s vápenatými, draselnými a jinými kationty.

Soli alkalických kovů a kovů alkalických zemin

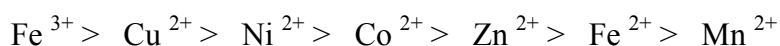
Tyto soli se dělí na humáty (soli HK) a fulváty (soli FK). Vznikají reakcí alkalických kationtů (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) s karboxylovými skupinami HL.

Komplexy s kovy

Komplexy s kovy vznikají, když dvě nebo více uspořádaných pozic okolo iontu kovu jsou obsazeny donorovými skupinami jednoduchých ligandů, čímž se potom vytvoří vnitřní kruhová struktura. V půdě roli ligandů plní jednoduché organické sloučeniny a funkční skupiny HL. Afinity funkčních skupin HL k tvorbě vazby s kovy klesá v následujícím pořadí:

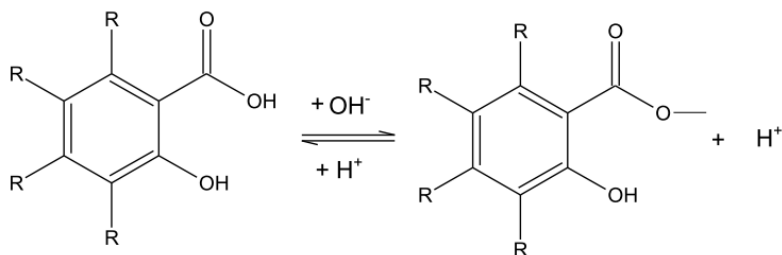


Schopnost kovových iontů tvořit komplexy klesá v pořadí:

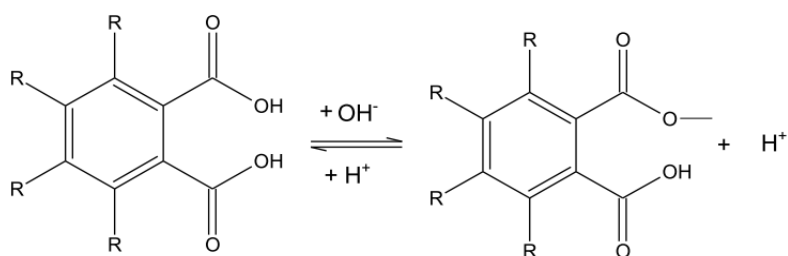


Schopnost HK a FK tvořit komplexy vyplývá hlavně z toho, že obsahují kyslíkaté funkční skupiny, např. karboxylové, fenolické a karbonylové. [11]

Afinity reakcí huminových kyselin s kovovými ionty, především reakcí karboxylové skupiny s ionty se zvyšuje v přítomnosti kyslíkaté funkční skupiny v ortho poloze vůči karboxylové skupině. Vznikají tak bifunkční koordinační místa. V HK jsou to především salicylové nebo dikarboxylové typy:

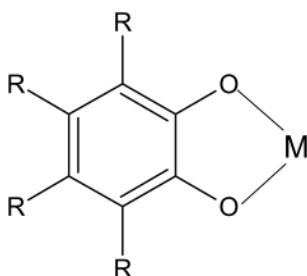


Obr. 5 Salicylové typy



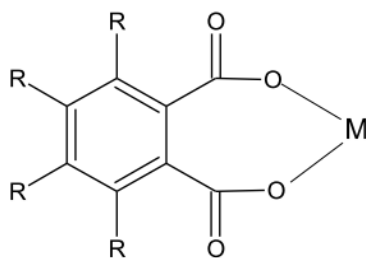
Obr. 6 Dikarboxylové typy

Ortho uspořádání fenolických skupin vůči karboxylové skupině, je žádoucí k vytvoření vhodně stabilních komplexů, které jsou poutány silnými vazbami. Kdyby fenolická skupina byla v poloze meta nebo para vůči karboxylové skupině, k vytvoření komplexu by nedocházelo. [11]



Obr. 7 Vazba kovu na dvě fenolové skupiny v ortho poloze

K tvorbě komplexů dochází také v případě, že dvě karboxylové skupiny jsou k sobě v poloze ortho. Vázání kovového iontu přes karboxylové skupiny má nižší chelatující efekt. Vazba kovu na dvě fenolické skupiny v ortho poloze je slabší kvůli relativně nízké vazebné energii fenolického kyslíku s kovy při vytváření značně napnutého nelatujícího kruhu. [11]



Obr. 8 Vazba kovu na dvě karboxylové skupiny v ortho poloze

Vzhledem k tomu, že huminové kyseliny se v roztoku chovají jako polyanionty, vícemocné kovové ionty s velkou afinitou vzhledem k HK jsou schopny síťovat huminové kyseliny. Takto může vzniknout hydrogel huminových kyselin z roztoku humátu a chloridu měďnatého, který obsahuje právě ionty Cu^{2+} , které zapříčiní síťování huminových kyselin a vznik

hydrogelu odlišných vlastností oproti tradičně připravovanému hydrogelu – srážení roztoku humátu koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou [11].

3.2.5 Stanovení entalpie pomocí kalorimetrie

Metody termické analýzy sledují vlastnosti systému (hmotnost, energii, rozměr, vodivost a další) jako dynamickou funkci teploty. Pro tyto metody je základním důležitým jevem změna entalpie (ΔH). Každou fyzikální a chemickou změnu lze charakterizovat změnou obsahu Gibbsovy volné energie (ΔG). [12]

Každý systém se snaží dosáhnout takového stavu, kterému odpovídá nižší hodnota Gibbsovy volné energie. Příkladem přeměny může být tání, var, sublimace, krystalická přeměna apod. Každou přeměnu charakterizuje teplota a změna entalpie. Změnu entalpie může provázet i změna hmotnosti sledované látky. [12]

Diplomová práce je především zaměřena na stanovení entalpie pomocí isothermické titrační kalorimetrie.

Obecně lze tyto interakce modelovat reakcemi makromolekuly M s menšími ligandy X podle schématu, které je možno napsat v souhrnně ve tvaru (1): [13, 14]



Díky titrační kalorimetrii jsme schopni vyhodnotit důležitá termodynamická data, která charakterizují kvalitu interakce mezi M a X. Konkrétně se jedná o rovnovážnou konstantu K (tzv. binding constant) a reakční teplo ΔH^0 (tzv. heat of binding), parametr n (number of sites), kterým je dána stechiometrie studovaného procesu. Následně lze ze získaných dat vyhodnotit standardní reakční Gibbsovu energii ΔG^0 . [13, 14]

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (2)$$

$$\Delta S^0 = \frac{\Delta H^0 - \Delta G^0}{T} \quad (3)$$

Podle hodnoty ΔG^0 je možno usoudit „jak ochotně“ reakce probíhá. Záporné hodnoty ΔG^0 indikují, že reakce probíhá zleva doprava. Čím je hodnota zápornější, tím reakce probíhá ochotněji (tím větší je i hodnota K). Jsou-li hodnoty ΔG^0 kladné, reakce samovolně neprobíhá tak, jak je zapsaná. Reakce by probíhala samovolně zprava doleva.

Z rovnice Gibbsovy energie, kterou pro konstantní teplotu platí ve tvaru:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (4)$$

Z rovnice (4) vyplývá, že hodnota ΔG^0 se skládá ze dvou členů entalpického (ΔH^0) a entropického ($-T\Delta S^0$).

Záporná hodnota reakční entalpie (teplo se uvolňuje) indikuje, že v reakci převládá energie uvolněná při tvorbě vazeb v produktu. Kladná hodnota ΔH^0 (tj., teplo se spotřebovává) indikuje, že v reakci převládá energie spotřebovaná na štěpení vazeb. [13, 14]

Reakční změna entropie souvisí s výslednou neuspořádaností děje. Záporné hodnoty ΔS^0 naznačují, že neuspořádanost systému klesá. Kladné hodnoty znamenají, že neuspořádanost stoupá. V případě reakcí (1) je zřejmé, že dochází ke vzniku větší uspořádanosti a tedy ΔS^0 je záporné. K tvorbě stabilních sloučenin MX_n , musí být ΔG^0 záporné. To znamená, že kladná hodnota členu ($-T\Delta S^0$) musí být převážena dostatečně velkou zápornou hodnotou ΔH^0 , která indikuje vznik pevných vazeb. [13, 14]

3.3 Metody charakterizace huminových kyselin

3.3.1 FT-IR spektrometrie

Infračervená spektrometrie je analytická metoda, která se zabývá identifikací a strukturní charakterizací organických sloučenin, v menší míře i anorganických látek. Slouží k měření a vyhodnocování absorpčních spekter molekul, které absorbují elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek 0,78-1 000 μm , což odpovídá vlnočtu 12 800-10 cm^{-1} . [15]

Infračervené záření má větší vlnovou délku a nižší energii než záření UV-VIS. Principem metody je absorpce infračerveného záření při průchodu vzorkem, kdy dochází ke změně rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. Analytickým výstupem je infračervené spektrum, které je grafickým vyjádřením závislosti energie, většinou vyjádřené v procentech transmitance (T) nebo jednotkách absorbance (A) na vlnové délce dopadajícího záření. [15]

Důležitou skutečností je relativní nezávislost vibrací jednotlivých částí molekuly (funkčních skupin) na ostatních molekulových vibracích. Toto je základ pro využití IR spektrometrie ve strukturní analýze. V důsledku toho mají totiž různé funkční skupiny relativně stálé vibrační frekvence bez ohledu na to, v jakých organických skeletech jsou přítomny. Absorpční pásy, které mají vrcholy v intervalu 4000 – 1500 cm^{-1} jsou vhodné pro identifikaci funkčních skupin (např. $-\text{OH}$, $\text{C}=\text{O}$, N-H , CH_3 a dalších). Pásy v oblasti 1500 – 400 cm^{-1} jsou nazývané oblastí „otisku palce“. Tyto píky jsou charakteristické pro funkční skupiny a studované látky. [16, 17, 18]

Infračervená spektroskopie poskytuje velké množství informací o významných skupinách atomů a typů vazeb, jako jsou hydroxylové skupiny, ketonické skupiny a jiné, dále pak informuje o pozici vybraných skupin v molekule huminové kyseliny. Díky této metodě, hojně využívané k charakterizaci, získáváme důležité doplňující informace o struktuře huminových kyselin. [17]

Fourierova transformace přinesla v oblasti IR spektroskopie zjednodušení a zkvalitnění měření. FT-IR spektrometry jsou přístroje pracující na principu interference spektra, které měří na rozdíl od disperzních přístrojů interferogram modulovaného svazku záření po průchodu vzorkem. Při měření dopadá na detektor vždy celý svazek záření. Takové uspořádání umožňuje experimenty, při nichž dochází k velkým energetickým ztrátám, to znamená, že můžeme měřit silně absorbující vzorky nebo můžeme analyzovat pevné či kapalné vzorky v odraženém světle při použití nástavců- reflektanční spektrometrie. FT-IR spektrum nabízí mnohem vyšší rozlišení než klasické IR spektrum. [15]

3.3.2 Potenciometrická a konduktometrická titrace

Tyto techniky jsou populární jako spektrochemické metody kvantitativní analýzy. Primárně jsou tyto metody založeny na měření potenciálu (potenciometrie) nebo převrácené hodnotě odporu tj. vodivosti (konduktometrie). Měření jsou v přímém vztahu k analytické koncentraci. Tyto vlastnosti jsou použity ke stanovení koncového bodu titrace. Metody jsou dostupné, jednoduché a levné. Podávají poměrně přesné výsledky. [19]

Potenciometrie

Potenciometrická titrace slouží ke stanovení bodu ekvivalence. Bod ekvivalence zjistíme z měření rozdílů potenciálů mezi dvěma elektrodami (indikační, srovnávací) ponořenými do titrovaného roztoku v závislosti na množství přidávaného odměrného roztoku.

Bod ekvivalence vyhodnotíme z potenciometrické křivky. Potenciometrické titrační křivky mají esovitý charakter. Bod ekvivalence odpovídá inflexní bodu křivky. [18, 20]

Konduktometrie

Během konduktometrické titrace měříme vodivost titrovaného roztoku. Změna vodivosti bývá vyvolávána výměnou jednoho iontu o určité pohyblivosti za ion s rozdílnou pohyblivostí. Nastane buď při nezměněné celkové koncentraci iontů, nebo naopak změnou celkové koncentrace iontů. Změna vodivosti nastává před nebo za bodem ekvivalence. Konduktometrické křivky jsou závislé na síle příslušné kyseliny nebo zásady. [18,20]

3.3.3 Izotermická titrační mikrokolorimetrie

V současné době se izotermická titrační kalorimetrie (ITC) stává často používanou metodou pro charakterizaci mezimolekulárních interakcí a rozpoznávání reakcí s vynikající citlivostí. Dokáže spolehlivě určit míru afinity.

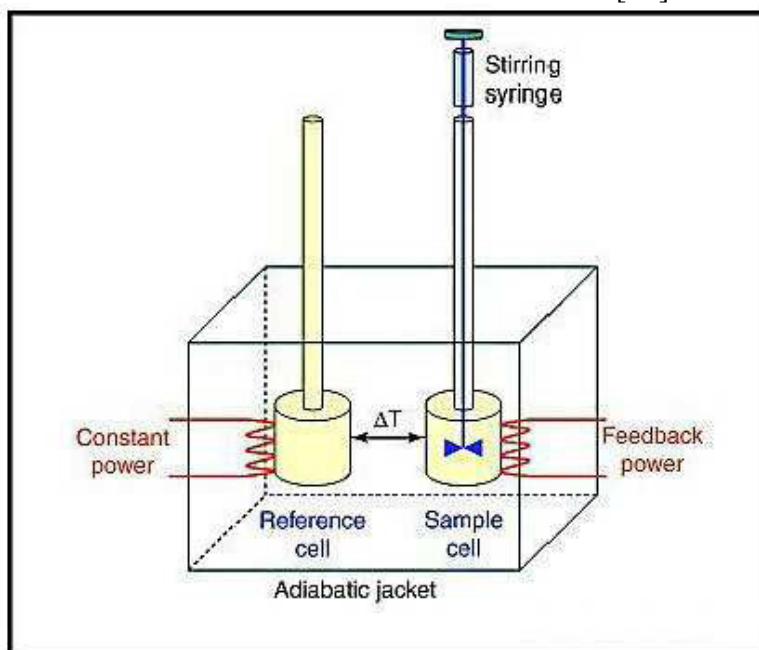
Touto technikou lze látky studovat nejen v roztoku, ale také v suspenzích, protože zákal nebo zbarvení nemá žádný vliv na měření. Dále mohou být termodynamické parametry interakce měřeny bez imobilizace, úpravy nebo označování vazebných partnerů a bez omezení molekulovou hmotností.

Obecný princip ITC se zakládá na měření tepla, které je generováno nebo absorbováno v interakci mezi dvěma molekulami. ITC se využívá k určení konstant stability, stechiometrie, interakce entalpií, za určitých podmínek i entropie, Gibbsovy volné energie a může být i touto metodou zjištěna změna tepelné kapacity. [21]

Údaje získané z ITC byly získány v mnoha oblastech, například polymerní chemie, nanotechnologie, buněčné biologie a biochemie. V dalších knihách byla zveřejněna aplikace při studiu biologických rozpoznávacích reakcích, při pozorování aktivity enzymů a biotechnologií, objevování léčiv – vývoji a rozvoji.

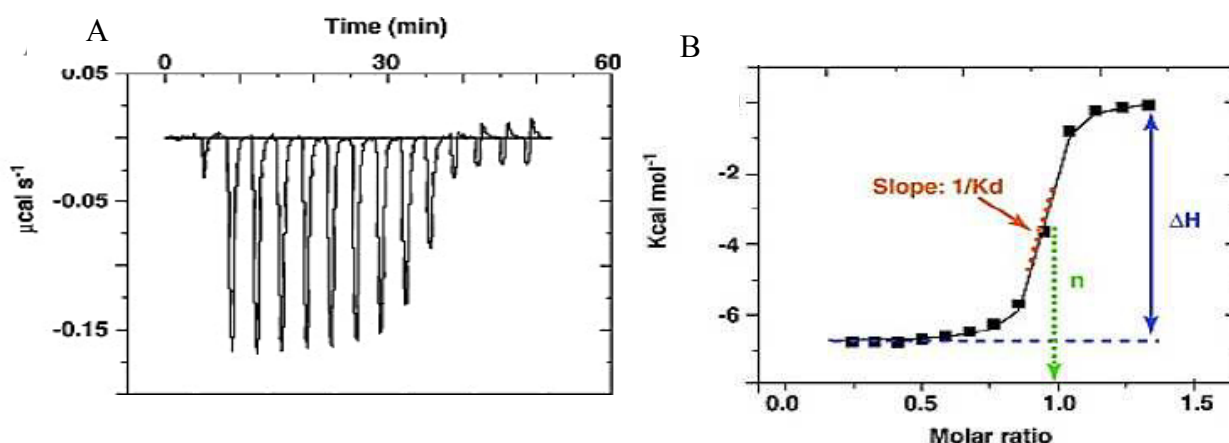
Izotermický titrační kalorimetr se skládá ze dvou cel, jedna cela je na vzorek měřící, druhá cela slouží jako referenční. Kalorimetr je vyroben z účinně tepelného vodivého materiálu, který je obklopen adiabatickým obalem. Stříkačka s kapilárou se používá k titraci roztoku do měřící cely obsahující vzorek. K detekci teplotních rozdílů mezi celami se používají citlivé

termoelektrické obvody. Při měření musí být zachovány isothermické podmínky mezi nimi ($\Delta T=0$). Schéma základního kalorimetru vidíme na obrázku č. 9. [22]



Obr. 9 Základní konfigurace isothermického titračního kalorimetru [22]

Během titračního procesu je pozorována změna teplotního toku uvnitř měřicí cely. Kalorimetr měří energii potřebnou k udržení izothermických podmínek mezi celami. Na grafu č. 10 (A) změny tepla v závislosti na čase (min) je vidět série píků proudění tepla. Oblast pod píky dává změnu vazebné entalpie (ΔH). Z grafu č. 10 (B) závislosti změny teplotního toku na koncentraci roztoku, se dají vyčíst informace o entalpii (ΔH), konstantě K , o stechiometrii vázání, která se dá použít k výpočtu změny entropie (ΔS) a Gibbsovy volné energie (ΔG). [22, 23, 24]



Obr. 10 (A) Prvotní údaje z ITC experimentu, (B) Závislost entalpie na koncentraci roztoku [22]

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

4.1 Využití modelů při studiích huminových kyselin, reaktivita HK

Matoucím při studování struktury byly interpretace UV–VIS měření bez znalosti struktury. Pro jejich zlepšení jsou používány modelové látky, ve kterých jsou studovány charakteristické skupiny podílející se na reaktivitě huminových kyselin. Autor práce [25] J. A. Tossell používal modely hydrochinonu a chinonu jako donor akceptorových komplexů pro vysvětlení NIR, IR a VIS spekter huminových kyselin. V jeho práci bylo prokázáno, že na podobu spekter ve studovaných oblastech mají vliv nejen substituenty na aromatických jádrech studovaných sloučenin, ale také vzdálenost mezi aromatickými kruhy. Při výpočtu volných energií pak zjišťoval, že donor akceptorové interakce ve zmíněném systému nevznikají z volných donorových a akceptorových komplexů, ale spíše z nucených či náhodných kontaktů donorových a akceptorových kruhů.

V práci [26] byla srovnávána reaktivita modelových látek strukturně podobných vazebným místům v huminových kyselinách vůči samotným huminovým kyselinám. Šlo o porovnávací studii vazebného chování kationtů mědi s huminovými kyselinami a jednoduchými organickými molekulami, založená na měření pomocí ultrazvukové spektrometrie. Jako modely byly použity jednoduché organické sloučeniny- hydroxykyseliny. Ve zmíněné studii byla využita metoda vysoce rozlišovací ultrazvukové spektroskopie, kdy bylo využito měření rychlosti propagace ultrazvuku, který je citlivý na intermolekulární interakce, během titrace organických modelů měďnatými ionty. Závislost rychlosti ultrazvuku na množství přidané mědi umožňuje stanovit jednotlivé interakce kovu s funkčními skupinami a určit místo vazby kovu na strukturu modelové sloučeniny. Pozorované rozdíly pro jednotlivé modely hydroxykyselin ukazují, že v kyselinách jsou přítomny aktivní vazebná centra ne jenom s různou silou a stabilitou u formovaných komplexů, ale také s různou pevností vazby a schopností konformačních změn. Závěrem byla potvrzena vysoká senzitivita použité metody pro dané měření.

V práci [11] byla provedena charakterizace struktury a vlastností huminových kyselin, fulvinových kyselin včetně jejich reaktivity s přechodnými prvky. Studie byla prováděna pomocí EPR a FT-IR spektroskopie. S následnou pomocí semiempirické INDO metody byly spočítány interakční energie komplexů s přechodnými prvky. Bylo zjištěno, že z HK a FK vznikají komplexy s přechodnými prvky především v místech s aromatickými strukturami obsahujícími karboxylové nebo hydroxylové funkční skupiny. Zároveň však jsou ve strukturách studovaných kyselin zahrnuta různá vazebná místa s různou silou interakce. Schopnost zachytu přechodných prvků ve struktuře by mohla být vhodná pro sanaci a odstranění obsahu přechodných prvků v půdě.

S tvorbou komplexů huminových kyselin a přechodných prvků se potýkají mnohé vědecké práce.

V článku [27] byla autory M. L. Antonellim a spol. studována komplexační kapacita fulvinových a huminových kyselin extrahovaných z řeky a jezerního sedimentu s ionty mědi. Vazebná kapacita byla studována pomocí titrace se selektivní elektrodou a pomocí kalorimetrie. Pro stejný účel byly také proměřovány komplexační reakce měďných iontů

s malými molekulami obsahujícími funkční skupiny podobné funkčním skupinám fulvinových kyselin. Výsledky naznačují, že se zvyšujícím se pH se zvyšuje podíl vázaného kovu ve fulvinové kyselině. To může být přisouzeno vzrůstu ionizace molekuly fulvinové kyseliny. Výsledky kalorimetrie pak ukazují, že celkový tepelný tok představuje zmenšující se exotermickou odpověď při titraci vzhledem ke stoupajícím pH hodnotám.

Schopnost adsorpce divalentních kationtů huminovými kyselinami je probírána ve vědecké práci Alexandra G. S. Prado [28]. V této práci byla porovnávána schopnost adsorpce komerčně připravené huminové kyseliny a huminové kyseliny extrahované z rašelinové půdy. Adsorpční proces u obou výše zmíněných kyselin byl spontánní a entropicky podporovaný i přes fakt, že byl endotermický. To může být vysvětleno uvolněním více než jednoho protonu pro každý adsorbovaný kationt, což způsobuje tzv. chelatační efekt, který je entropicky upřednostňován. Při pohledu na strukturní jednotky kyselin je možné přisuzovat adsorpci divalentních kationtů zejména díky dusíkovým a kyslíkovým atomům, přítomným v zásaditých aminech nebo kyslíkových centrech rozložených po celém biopolymerním povrchu huminových kyselin. [29]

Ve struktuře huminových kyselin může při jejich komplexaci také docházet k vzájemné kompetici o vazebná místa. Toto bylo sledováno v práci [30] o studiu vaznosti kationtů mědi a vápníku v rašelinových huminových kyselinách, vodních huminových kyselinách a fulvinových kyselinách pomocí iontové selektivní elektrochemie při různých experimentálních podmínkách zahrnujících např. změny pH, iontové síly roztoků, atd. Ke konstrukci základního modelu v této studii byly částečně využity Murrayovi a Linderovy modely (1983, 1984).

Model nebyl založen na nastavitelných parametrech, nýbrž na experimentálně odvozených proměnných, sledovaných u jednotlivých kyselin, především pak procentuálním složení uhlíku, vodíku, karboxylových a fenolových skupin. Ve studii se zabývali určením průměrné koncentrace vazebných míst u jednotlivých kyselin v závislosti na mnoha proměnných. Následně byl zahrnut možný model výpočtu k předurčení vazebné síly zmíněných kovů v huminových kyselinách. Avšak testy modelu prokázaly, že vazebné síly spočítané matematicky dle modelu, byly nižší než pozorované v experimentu, pravděpodobně díky podcenění různorodosti vazebných míst.

Interakce huminových sloučenin s ionty kovů z pohledu termodynamiky je sledována Nicholasem D. Bryanem a spol. [31]. V jejich studii jsou zahrnuty rašelinové a vodní huminové, fulvinové kyseliny s molární hmotností 2 800 (u vodních fulvinových kyselin) až po 40 500 (u rašelinových huminových kyselin) jednotek. Proměřovány byly entalpie při interakcích kyselin s několika kovovými ionty, vybrané ionty byly Cu^{2+} , Cd^{2+} , La^{3+} , a Al^{3+} . Měření probíhalo na mikrokolorimetru ve vodných roztocích s různou iontovou silou při koncentracích od 50 mmol. dm^{-3} do 5 mol. dm^{-3} . Bylo pozorováno, že kromě interakcí iontů La^{3+} při nízkých iontových silách roztoku, jsou takové titrace endotermické. Toto zjištění naprosto neodpovídá výsledkům, které byly očekávány při možných komplexačních reakcích charakteristických karboxylových, hydroxylových a fenolických skupin. Pokud si představujeme huminové kyseliny jako hmotu proniknutelnou ionty, která je v roztoku obklopena difúzní elektrickou dvojrivrstvou, je možný průběh komplexace spjat s vybitím

vzniklé dvojvrstvy. Entalpie tohoto procesu je exotermní. Ve studii je jako možné vysvětlení podána změna entropie systému, díky které komplexace probíhá.

Interakce huminových kyselin probíhá také například s proteiny. Ve studii [32] Wen Feng Tana a spol. byla studována interakce huminových kyselin s lysozymem. Bylo využito metody dynamického rozptylu světla a isotermální titrační kalorimetrie. K pokusu byla užita čištěná huminová kyselina z firmy Aldrich a byly připravovány její různé vzájemné hmotnostní poměry s lysozymem. Agregace kyseliny s proteinem byla umožněna pomocí KCl. Bylo zjištěno, že při dosažení isoelektrického bodu roztoku dochází k agregaci v maximální velikosti agregátů 80 nm. Toho může být využito při studiu možného zachycování patogenních proteinů v půdě právě huminovými kyselinami.

V článku [33] byla titrační kalorimetrie použita k určení protonizačních a ionizačních entalpií huminových kyselin z rašelinových půd a akvatických huminových a fulvinových kyselin při proměnném pH. Byly použity roztoky chloridu sodného a tetraethylammoného chloridu. Bylo zjištěno, že protonační entalpie prokazuje vyšší přesnosti průběhu entalpie při vázání a uvolnění protonu. Pod hodnotou pH 7 byly protonační entalpie kyselin podobné jednoduchým karboxylovým kyselinám a nebyl zřejmý žádný vliv iontové síly roztoku. V zásadité oblasti, při pH vyšším než 9 byly naměřené entalpie podobné jednoduchým fenolickým kyselinám. Nižší exotermické hodnoty byly pozorovány při iontové síle roztoku $I = 0,1$ M. U roztoku NaCl bylo toto přisuzováno přerušením vodíkových můstků mezi fenolickými vodíky a přilehlými funkčními skupinami obsahujícími kyslík vlivem iontu Na^+ . Protonační entalpie jako funkce pH a koncentrace roztoků odhalují informace o původu a umístění kyselých funkčních skupin huminových substancí.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie

humínové kyseliny
voda čištěná přístrojem PURELAB-flex
hydroxid draselný, p.a., Lach-Ner s.r.o.
dusičnan měďnatý trihydrát, PENTA
kyselina dusičná p.a., Lach-Ner, s.r.o.
dusičnan draselný, Lachema
kyselina salicylová, Lachema
kyselina ftalová, Sigma-Aldrich
fenol, PENTA
pyrokatechol, Sigma Aldrich
kyselina benzoová, Lachema
chlorid měďnatý dihydrát, p.a., Lach-Ner, s.r.o.
hydroxid sodný (Normex), Carlo Erba Reagents Group

5.2 Použité přístroje a zařízení

pH metr (Mettler Toledo)

analytické váhy Sealtec SBC 31

FT-IR spektrometr Nicolet Impact 400

automatický titrátor Titroline Alpha plus Schott

kombinovaný altimetr Mettler Toledo SevenMulti s pH elektrodou a vodivostní sondou

mikrokolorimetr TAM III (TA Instruments, USA)

5.3 Příprava vzorků a odměrných roztoků

5.3.1 Příprava huminových kyselin

Humínové kyseliny byly připraveny alkalickou extrakcí jihomoravského lignitu. Lignit byl extrahován směsí 0,5 M NaOH a 0,1 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ v poměru 120 g lignitu na litr roztoku. Vzniklá suspenze byla ponechána přes noc v lednici. Následující den byl slit roztok nad pevnou fází do nádoby a okyselen 20 % HCl na pH~1. Pevná fáze byla opět extrahována 1 dm³ extrakčního roztoku. Po hodině míchání bylo provedeno slítí a okyselení roztoku 20 % HCl na pH~1. Takto okyselené roztoky byly ponechány přes noc v lednici. Následně byly vysrážené HK od roztoku odděleny odstředěním (4000 RPM) a promývány destilovanou vodou do vymytí chloridových iontů. HK byly vysušeny v sušárně při 50 °C.

5.3.2 Příprava odměrných roztoků

Odměrné roztoky 0,1 M KOH, 0,1 M KNO₃, 0,1 M HNO₃, 0,1 M NaOH

Odměrné roztoky 0,1 M KOH, 0,1 M KNO₃, 0,1 M HNO₃, 0,1 M NaOH byly připraveny navážením přesného množství dané látky do odměrných baněk o objemu 1 dm³. Odměrné baňky byly následně doplněny vodou po rysku. Voda byla přečištěna přístrojem PURELAB-flex.

5.3.3 Příprava odměrných (titračních) roztoků

Titrační roztoky 0,1 M, 0,5 M a 1 M Cu(NO₃)₂, 0,1 M, 0,5 M a 1 M CuCl₂

Bylo naváženo přesné množství Cu(NO₃)₂·3H₂O a CuCl₂, tak aby odpovídalo požadovaným koncentracím, do odměrných baněk o objemu 0,25 dm³. Odměrné baňky byly doplněny vodou, která byla přečištěna pomocí přístroje PURELAB-flex, po rysku.

5.4 Postup práce

5.4.1 Charakterizace huminových kyselin

V této kapitole bylo hlavní náplní charakterizovat vzorek huminových kyselin, se kterými bylo pracováno. Huminové kyseliny byly charakterizovány vybranými metodami: elementární analýzou, titracemi vedoucími ke stanovení celkové a karboxylátové kyselosti. K získání důležitých doplňujících informací byla použita FT-IR spektrometrie.

Elementární analýza HK. Po promytí destilovanou vodou a usušení při 50 °C, byl vzorek HK podroben elementární analýze na Ústavu struktury a mechaniky hornin Akademie věd České republiky v Praze, pomocí přístroje CHNSO Mikroanalyzátor Flash 1112 (Carlo Erba).

Stanovení kyselosti HK pomocí titrací byla jedna z dalších charakterizací studované huminové kyseliny. Potenciometrickými a konduktometrickými titracemi byla zjišťována celková kyselost a karboxylátová kyselost. Celkovou kyselost jsme zjistili zpětnou a přímou titrací. Obsah karboxylátových skupin byl získán pomocí titrace s použitím octanu vápenatého. Jednotlivé titrace byly prováděny na automatickém titrátoru, který byl propojen s kombinovaným altimetrem a počítačem. Pomocí softwaru byly zaznamenávány naměřené hodnoty vodivosti a pH, toto zapisování probíhalo v nastavených časových intervalech.

Postupy jednotlivých titrací:

- a) Celková kyselost – zpětná titrace
- b) Celková kyselost – přímá titrace
- c) Karboxylátová kyselost

ad a)

Požadovaná navážka přibližně 100 mg vzorku huminových kyselin byla rozpuštěna v 0,01 M NaOH o objemu 100 ml. Odměrný roztok 0,01 M NaOH byl připraven z normalu. Vzniklý roztok byl dále nechán míchat hodinu na magnetické míchačce kvůli dokonalému rozpuštění huminových kyselin. Rozpuštěná huminová kyselina v hydroxidu sodném byla

následně titrována 0,05 M HCl automatickým titrátorem s konstantním přídávkem 0,05 ml v intervalu 30 s, tento přídavek byl realizován až do dosažení celkového objemu titračního činidla 30 ml. Každých 5 vteřin byla zaznamenávána naměřená hodnota pH a vodivosti. Celková kyselost se určuje z rozdílu spotřeby titračního činidla pro titraci přebytku NaOH (1. zlom vodivostní křivky, 1. inflex na křivce pH) a celkové spotřeby při vytitrování kyselých skupin HK (2. zlom na vodivostní křivce, 2. inflex na křivce pH).

ad b)

Požadovaná navážka přibližně 100 mg vzorku huminových kyselin byla suspendována v destilované vodě o objemu 100 ml. Jako v předchozím případě byla suspenze HK míchána na magnetické míchačce s tím rozdílem, že byla míchána 24 hodin. Po uplynulých 24 hodinách byla provedena přímá titrace pomocí automatického titrátoru. Suspenze HK ve vodě byla titrována titračním činidlem 0,05 M NaOH s konstantním přídávkem 0,05 ml v časovém intervalu 5 min, tento přídavek byl realizován až do dosažení celkového objemu titračního činidla 30 ml. Každých 30 vteřin byly zaznamenávány naměřené hodnoty pH a vodivosti. Celková kyselost byla určena ze spotřeby titračního činidla, odpovídající hodnotě inflexního bodu na křivce pH, resp. zlomu na vodivostní křivce.

ad c)

Požadovaná navážka přibližně 100 mg vzorku huminových kyselin byla převedena do 125 ml Erlenmayerovy baňky. K navážce HK bylo přidáno 10 ml 0,5 M octanu vápenatého a 40 ml destilované vody. Ve druhé Erlenmayerově baňce byl zároveň připraven slepý vzorek. Ve slepém vzorku bylo 10 ml 0,5 M octanu vápenatého a 40 ml destilované vody. Oba vzorky v Erlenmayerových baňkách, které byly zazátkovány, byly míchány na magnetické míchačce po dobu 24 hodin. Po uplynulých 24 hodinách byly roztoky přefiltrovány přes filtrační nálevku a byly promyty destilovanou vodou.

Uvolněná kyselina octová byla stanovena titrací za použití automatického titrátoru. Roztok byl titrován titračním činidlem 0,1 M NaOH s konstantním přídávkem titračního činidla 0,05 ml v časovém intervalu 30 vteřin, tento přídavek byl realizován až do dosažení celkového objemu 10 ml. Stejný postup titrace byl aplikován na slepý vzorek. Karboxylátová kyselost byla určena z rozdílu uvolněného množství kyseliny octové ve vzorku huminových kyselin a ve slepém vzorku. Druhým způsobem je zjistit toto množství ze spotřeby titračního činidla odpovídající hodnotě $pH=9,8$.

Z dat získaných při titracích byla vypočítána zdánlivá hodnota pK_a vzorku huminových kyselin určená z Henderson-Hasselbachovy rovnice (5)

$$pH = pK_a - \log \frac{\alpha}{1 - \alpha} \quad (5)$$

α je stupeň disociace, vypočítává se ze vztahu (6)

$$\alpha = \frac{c_{\text{NaOH}} V_{\text{NaOH}} + [\text{H}^+] \cdot (V_{\text{susp}} + V_{\text{NaOH}})}{b_c \cdot g_{\text{HA}}} \quad (6)$$

c_{NaOH}	molární koncentrace odměrného roztoku
V_{NaOH}	molární objem odměrného roztoku
V_{susp}	objem suspenze před titrací
$[\text{H}^+]$	koncentrace H^+
b_c	celková kyselost
g_{HA}	navážka vzorku huminové kyseliny

FT-IR spektrometrie byla použita k získání doplňujících informací o vzorku huminové kyseliny. K měření byl použit přístroj FT-IR spektrometr Nicolet Impact 400 a lis na výrobu KBr tablet. Jako první jsem připravila KBr tabletu. KBr bylo rozetřeno v achátové misce. Rozetřený KBr byl žihán v hliníkové misce po dobu 20 min. Dále jsem zhomogenizovala směs vysušeného KBr se sytkým vzorkem huminové kyseliny. Ve speciálním lisu na výrobu tablet byla vylisována transparentní tableta, která byla vložena do spektrofotometru. Bylo naměřeno infračervené spektrum vzorku v rozsahu vlnočtu od 400 do 4000 cm^{-1} .

Výsledky elementární analýzy, výsledné kyselosti huminových kyselin a získané infračervené spektrum huminové kyseliny jsou uvedeny v následující kapitole 6.1 pojednávající o výsledcích a diskuzích diplomové práce.

5.4.2 Optimalizace metody měření na mikrokolorimetru TAM III

Postupy, které vedly k optimalizaci metody

Jelikož nebyly známy předchozí postupy pro měření isothermické titrační kalorimetrie aplikovatelné na huminové kyseliny, musely být vyzkoušeny různé postupy měření, podle kterých bylo dosaženo reprodukovatelných a použitelných výsledků.

- 1) Byla připravena **suspenze** huminových kyselin o koncentraci 20 g /l [28] do odměrné baňky o objemu 100 cm^3 . Navážka HK byla kvantitativně převedena do odměrné baňky a doplněna vodou po rysku.

Pro titraci byly jako titrační roztoky připraveny roztoky 0,1 M CuCl_2 a 0,01 M CuCl_2 . Navážky chloridu měďnatého byly kvantitativně převedeny do odměrných baněk o objemu 50 cm^3 a doplněny po rysku čistou vodou.

Postup a nastavení přístroje TAM III

- do měrné ocelové cely bylo mikropipetou napipetováno 1 ml vzorku (HK, voda), uvnitř cely bylo připevněno zlaté míchadlo, cela byla uzavřena a postupně zasouvána do přístroje,
- bylo nastaveno míchání na 90 otáček za minutu,
- do druhé ocelové cely byl dán referentní vzorek - voda, cela byla uzavřena a postupně zasouvána do přístroje,
- stříkačka s kapilárou (Hamilton, objem 250 μl , kapilára- ocel) byla naplněna titračním roztokem opatrně, tak aby neobsahovala bubliny,

- po zasunutí obou cel do přístroje, byla do měrné cely zasunuta kapilára ze stříkačky, ve které byl titrační roztok.
 - *nastavení měření*
 - počet injekcí 50
 - přídavek 5 μ l, doba přídavku 5 s
 - interval mezi přídavky 10 min, doba měření 8 hodin
 - celkový objem titračního roztoku: 250 μ l
 - teplota 25 °C
 - *realizovaná měření tímto postupem*
 - suspenze HK o koncentraci 20 g/l byla titrována 0,1 M CuCl_2
 - slepý vzorek: voda titrována 0,1 M CuCl_2
 - slepý vzorek: voda titrována 0,01 M CuCl_2
- 2) Byly připraveny **suspenze** huminových kyselin o koncentraci 20 g /l a 10 g /l. Postup výroby suspenzí stejný jako v bodě 1).

Pro titraci byla jako titrační roztok vybrána destilovaná voda.

Postup a nastavení přístroje TAM III

- do měrné ocelové cely bylo mikropipetou napipetováno 800 μ l vzorku (HK-20 g/l, 10 g/l), uvnitř cely bylo připevněno zlaté míchadlo, cela byla uzavřena a postupně zasouvána do přístroje,
 - bylo nastaveno míchání na 90 otáček za minutu,
 - do druhé ocelové cely byl dán referentní vzorek - voda, cela byla uzavřena a postupně zasouvána do přístroje,
 - stříkačka s kapilárou (Hamilton, objem 250 μ l, kapilára- ocel) byla naplněna titračním roztokem opatrně, tak aby neobsahovala bubliny,
 - po zasunutí obou cel do přístroje, byla do měrné cely zasunuta kapilára ze stříkačky, ve které byl titrační roztok.
 - *nastavení měření*
 - počet injekcí 40
 - přídavek 5 μ l, doba přídavku 5 s
 - interval mezi přídavky 35 min, doba měření 24 hodin
 - celkový objem titračního roztoku: 200 μ l
 - teplota 25 °C
 - *realizovaná měření tímto postupem*
 - suspenze HK o koncentraci 20 g/l byla titrována vodou, měření prováděno 2x
 - suspenze HK o koncentraci 10 g/l byla titrována vodou, měření prováděno 2x
- 3) Byla připravena **suspenze** huminových kyselin o koncentraci 20 g/l. S tím rozdílem, že nebyl připraven odměrný roztok, ale suspenze byla připravena **přímo v cele**.

Pro titraci byly jako titrační roztoky připraveny roztoky 0,1 M CuCl₂ a 0,5 M CuCl₂. Navážky chloridu měďnatého byly kvantitativně převedeny do odměrných baněk o objemu 50 cm³ a doplněny po rysku čistou vodou.

Postup a nastavení přístroje TAM III

- do měrné ocelové cely bylo naváženo 16 mg HK (odpovídá koncentraci 20 g/l), mikropipetou bylo napipetováno 800 µl vody-příprava suspenze HK, uvnitř cely bylo připevněno zlaté míchadlo, cela byla uzavřena a postupně zasouvána do přístroje
 - bylo nastaveno míchání na 90 otáček za minutu,
 - do druhé ocelové cely byl dán referentní vzorek - voda, cela byla uzavřena a postupně zasouvána do přístroje,
 - stříkačka s kapilárou (Hamilton, objem 250 µl, kapilára- ocel) byla naplněna titračním roztokem opatrně, tak aby neobsahovala bubliny,
 - po zasunutí obou cel do přístroje, byla do měrné cely zasunuta kapilára ze stříkačky, ve které byl titrační roztok.

 - *nastavení měření*
 - počet injekcí 40
 - přídavek 5 µl, doba přídavku 5 s
 - interval mezi přídavky 35 min, doba měření 24 hodin
 - celkový objem titračního roztoku: 200 µl
 - teplota 25 °C

 - *realizovaná měření tímto postupem*
 - suspenze HK o koncentraci 20 g/l byla titrována 0,1 M CuCl₂
 - suspenze HK o koncentraci 20 g/l byla titrována 0,5 M CuCl₂
 - suspenze HK o koncentraci 20 g/l byla titrována vodou, měření provedeno 2x
- 4) Byly připraveny **solý** huminových kyselin o koncentraci 20 g/l, 10 g/l a nejnižší koncentrace činila 1 g/l. Přesně navážené množství HK bylo kvantitativně převedeno do kádinky, následně bylo přidáno 10 ml 0,1 M NaOH, roztok byl míchán pomocí magnetické míchačky do úplného rozpuštění HK. Po rozpuštění HK bylo k roztoku přidáno stejné množství 10 ml 0,1 M HNO₃.

Tabulka 1 *Připravené vzorky solí*

Vzorek	Koncentrace (g/l)	Navážka (g)
sol 1	20	0,402
sol 2	10	0,201
sol 3	1	0,0201

Pro titrace solí HK byly připraveny titrační roztoky chloridu měďnatého rozpuštěného v 0,1 M dusičnanu draselném, ve třech různých koncentracích. Tyto koncentrace byly 0,1 M CuCl₂, 0,5 M CuCl₂, 1 M CuCl₂. Vždy bylo naváženo množství chloridu měďnatého o odpovídající požadované koncentraci do odměrné baňky. Odměrná baňka byla doplněna po rysku roztokem 0,1 M dusičnanu draselného.

Postup a nastavení přístroje TAM III

- do měrné ocelové cely bylo mikropipetou napipetováno 800 μl vzorku solu, uvnitř cely bylo připevněno zlaté míchadlo, cela byla uzavřena a postupně zasouvána do přístroje,
- bylo nastaveno míchání na 90 otáček za minutu,
- do druhé ocelové cely byl dán referentní vzorek (voda, titrační roztok), cela byla uzavřena a postupně zasouvána do přístroje ,
- stříkačka s kapilárou (Hamilton, objem 250 μl , kapilára- zlato) byla naplněna titračním roztokem opatrně, tak aby neobsahovala bubliny,
- po zasunutí obou cel do přístroje, byla do měrné cely zasunuta kapilára ze stříkačky, ve které byl titrační roztok.

- *nastavení měření*
 - počet injekcí 40
 - přídavek 5 μl , doba přídavku 5 s
 - interval mezi přídavky 35 min, doba měření 24 hodin
 - celkový objem titračního roztoku: 200 μl
 - teplota 25 $^{\circ}\text{C}$

- *realizovaná měření tímto postupem*
 - vzorek HK o koncentraci 1 g/l byl titrován 0,1 M CuCl_2
 - vzorek HK o koncentraci 10 g/l byl titrován 0,5 M CuCl_2
 - vzorek HK o koncentraci 20 g/l byl titrován 0,5 M CuCl_2
 - vzorek HK o koncentraci 20 g/l byl ještě titrován 1 M CuCl_2
 - jako referentní vzorek byl do druhé ocelové cely dán vždy titrační roztok, který se používal při dané titraci
 - byly měřeny slepé vzorky: sol 1 byl titrován prostředím (0,1 M NaOH + 0,1 M HNO_3), druhý slepý vzorek byla titrace solu1 vodou, jako poslední slepý vzorek byla titrace solu 1 roztokem 0,1 M KNO_3

shrnutí měření solů je uvedeno v tabulce č. 2

Tabulka 2 *Jednotlivé titrace solů*

vzorek	titrace CuNO_3 [M]
sol 1	1
sol 1	0,5
sol 2	0,5
sol 3	0,1

Optimalizovaný postup k měření na mikrokolorimetru TAM III

Isotermická titrační kalorimetrie

Byly použity HK ve třech různých koncentracích vodných roztoků (**solů**). Nejvyšší koncentrace byla vybrána 20 g/l (podle článku), další koncentrace byla zvolena 10 g/l a nejnižší koncentrace činila 1 g/l. Přesně navážené množství HK bylo kvantitativně

převědno do kádinky, následně bylo přidáno 10 ml 0,1 M KOH, roztok byl míchán pomocí magnetické míchačky do úplného rozpuštění HK. Po rozpuštění HK bylo k roztoku přidáno stejné množství 10 ml 0,1 M HNO₃. Tímto postupem byly vyrobeny vzorky (Tabulka č. 3):

Tabulka 3 *Připravené vzorky huminových kyselin*

Vzorek	Koncentrace (g/l)	Navážka (g)
sol 1	20	0,402
sol 2	10	0,201
sol 3	1	0,0201

K měření isotermické titrační kalorimetrie pro porovnání s výsledky huminových kyselin byly vybrány jednoduché organické sloučeniny. Jako tzv. modely. Těmito modely byly kyselina benzoová, kyselina fталová, kyselina salicylová, fenol a pyrokatechol. Jednalo se o molekuly obsahující karboxylové a hydroxylové skupiny.

Roztoky těchto modelů byly připraveny ve 3 stejných koncentracích jako huminové kyseliny, navážku jsme získaly výpočtem přes počet karboxylových a hydroxylových skupin, přesněji řečeno z jejich kyselostí, tak aby odpovídaly kyselosti huminových kyselin o koncentraci 20 g/l, 10 g/l, 1 g/l (tabulka č. 4, 5). Přesná navážka byla převedena do odměrné baňky a doplněna po rysku roztokem 0,1 M KNO₃. Nepodařilo se ovšem tímto způsobem připravit všechny roztoky modelových sloučenin o daných koncentracích. Tato skutečnost byla způsobena malou rozpustností některých organických sloučenin ve vodném prostředí. (tabulka č. 5)

Tabulka 4 *Modely huminových kyselin – obsah COOH, OH skupin, kyselost*

Vzorek	sumárně	M _r [g/mol]	COOH	OH	Σ	COOH	OH	Σ
HK	-	-	-	-	-	2,22	1,9	4,12
benzoová kyselina	C ₇ H ₆ O ₂	122,12	1	0	1	8,19	0	8,19
ftalová kyselina	C ₈ H ₆ O ₄	166,13	2	0	2	12,04	0	12,04
salicylová kyselina	C ₇ H ₆ O ₃	138,12	1	1	2	7,24	7,24	14,48
fenol	C ₆ H ₆ O	94,11	0	1	1	0	10,63	10,63
pyrokatechol	C ₆ H ₆ O ₂	110,11	0	2	2	0	18,16	18,16
			počet skupin v molekule			kyselost [mmol/g HK]		

Tabulka 5 *Rozpustnost modelů, připravené vzorky ✓*

Vzorek	rozpustnost [g/l]	Navážky [g/l]			Připravené vzorky		
		1 g/l	10 g/l	20 g/l	1 g/l	10 g/l	20 g/l
HK	-	1	10	20	✓	✓	✓
benzoová kys.	3,4	0,5032	5,0315	10,0629	✓	✗	✗
ftalová kys.	6	0,3422	3,4223	6,8446	✓	✓	✗
salicylová kys.	2	0,2845	2,8453	5,6907	✓	✗	✗
fenol	82,8	0,3878	3,8775	7,7549	✓	✓	✓
pyrokatechol	200	0,2268	2,2683	4,5366	✓	✓	✓

Pro titrace HK a modelů byly připraveny stejné titrační roztoky dusičnanu měďnatého rozpuštěného v 0,1 M dusičnanu draselném, ve třech různých koncentracích. Tyto koncentrace byly 0,1 M $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, 0,5 M $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, 1 M $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$. Vždy bylo naváženo množství dusičnanu měďnatého o odpovídající požadované koncentraci do odměrné baňky. Odměrná baňka byla doplněna po rysku roztokem 0,1 M dusičnanu draselného.

Postup a nastavení přístroje TAM III

- do měrné ocelové cely bylo mikropipetou napipetováno 500 μl vzorku (HK, model), uvnitř cely bylo připevněno zlaté míchadlo, cela byla uzavřena a postupně zasouvána do přístroje,
- bylo nastaveno míchání na 90 otáček za minutu,
- do druhé ocelové cely byl dán referentní vzorek (voda, titrační roztok), cela byla uzavřena a postupně zasouvána do přístroje,
- stříkačka s kapilárou (Hamilton, objem 250 μl , kapilára-zlato nebo ocel podle výběru titračního roztoku) byla naplněna titračním roztokem opatrně, tak aby neobsahovala bubliny,
- po zasunutí obou cel do přístroje, byla do měrné cely zasunuta kapilára ze stříkačky, ve které byl titrační roztok.

- *nastavení měření*
 - počet injekcí 50
 - přídavek 5 μl , doba přidavku 5 s
 - interval mezi přidavky 10 min, doba měření 8 hodin
 - celkový objem titračního roztoku: 250 μl
 - teplota 25 °C

- *realizovaná měření optimalizovaným postupem*
 - vzorek HK a modelů o koncentraci 1 g/l byly titrovány 0,1 M $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$
 - vzorek HK a modelů o koncentraci 10 g/l byly titrovány 0,5 M $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$
 - vzorek HK a modelů o koncentraci 20 g/l byly titrovány 0,5 M $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$
 - vzorek HK o koncentraci 20 g/l byl ještě titrován 1 M $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$
 - jako referentní vzorek byl do druhé ocelové cely dán vždy titrační roztok, který se používal při dané titraci,
 - byly měřeny slepé vzorky: titrace prostředí, ve kterém byl vzorek HK. 0,1 M KOH + 0,1 M HNO_3 titrováno vodou. Druhý slepý vzorek bylo titrování prostředí roztokem 0,1 M KNO_3 , třetí slepý vzorek byla titrace solu 1, který byl titrován prostředím, ve kterém byla HK (0,1 M KOH + 0,1 M HNO_3)
 - všechny prováděné titrace byly pro kontrolu měřeny 2x, vícekrát se z hlediska dlouho trvající titrace (několik hodin) neprovádělo.

shrnutí měření solů a modelů je uvedeno v tabulce č. 6

Tabulka 6 *Shrnutí měření optimalizovaným postupem*

vzorek	titrace CuNO_3 [M]
sol 3	0,1
benzoová 1g/l	0,1
ftalová 1g/l	0,1
salicylová 1 g/l	0,1
fenol 1 g/l	0,1
pyrokatechol 1 g/l	0,1
sol 2	0,5
ftalová 10 g/l	0,5
pyrokatechol 10 g/l	0,5
fenol 10 g/l	0,5
sol 1	0,5 1
fenol 20 g/l	0,5
pyrokatechol 20 g/l	0,5



Obr. 11 *Titrační cela mikrokalorimetru TAM III*

Ze získaných dat z mikrokolorimetru TAM III, při měření solů huminových kyselin byly získávány hodnoty entalpií jednotlivých reakcí a byly vytvářeny grafy závislosti entalpií na přidavku měďnatých iontů. Z jednotlivých měření bylo možné poznat, kdy reakce proběhla a byla měď navázána na všechna vazebná místa v huminových kyselinách, předpokládáme, že se Cu^{2+} navazuje na karboxylové a hydroxylové skupiny, což ve skutečnosti nemusí vždy úplně odpovídat realitě, protože Cu^{2+} ionty jsou schopny se vázat též na jiná vazebná místa.[34]

Z titračních měření modelových sloučenin byly také získány hodnoty entalpií jednotlivých reakcí, stejně jako v případě měření solů. Výsledky entalpií byly porovnávány s modely předchozí studie [11, 26], tyto modely byly přirovnávány s výslednými výsledky entalpií z jednotlivých měření.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Charakterizace huminových kyselin

Elementární analýza HK

Huminové kyseliny jsou všeobecně považovány za komplexní aromatické makromolekuly. Největší zastoupení v huminových kyselinách mají prvky uhlík, vodík, kyslík, dusík, síra a fosfor. Tato skutečnost se potvrdila ve výsledcích elementární analýzy. Největší zastoupení v huminových kyselinách z jihomoravského lignitu mají uhlík a vodík, o něco méně je zastoupen kyslík a minimální množství prakticky zanedbatelné jak vidíme ve výsledcích elementární analýzy je u dusíku a síry. Bylo zjištěno, že HK mají 30, 53 % popela, vlhkost 5, 54 %.

Tabulka 7 *Zastoupení prvků v HK v atomových %, vztaženo na vzorek bez popela*

prvek	množství (at. %)
uhlík	41,14
vodík	45,07
kyslík	12,85
dusík	0,81
síra	0,14

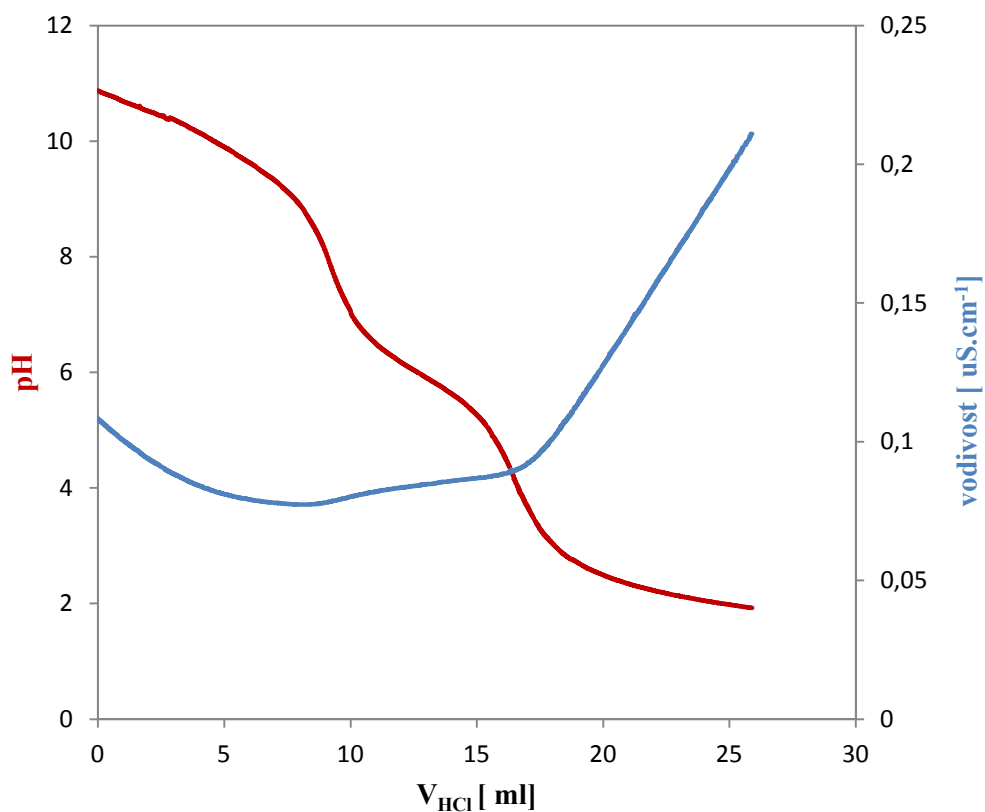
Stanovení kyselosti HK

Ze získaných dat vodivosti a pH závislých na přidavku titračního činidla, byly sestaveny grafy, ze kterých byly vypočítány kyselosti HK - celková kyselost huminové kyseliny a karboxylátová kyselost.

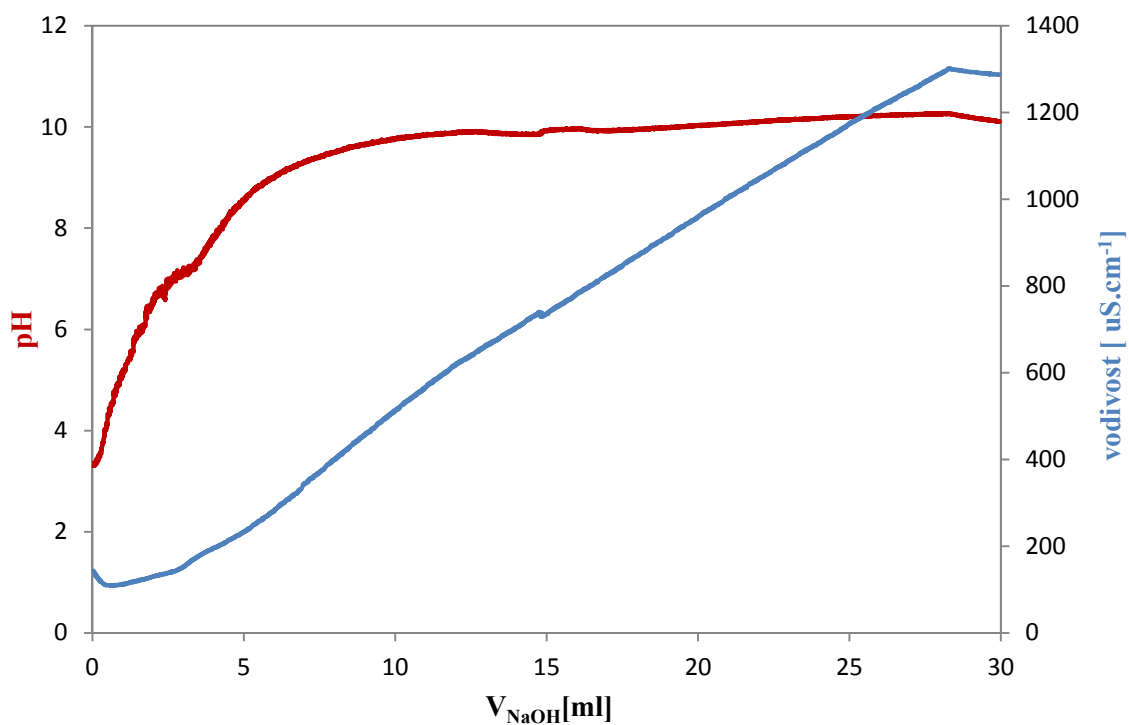
Zde uvedená hodnota celkové kyselosti byla vypočítána zprůměrováním hodnot celkové kyselosti získané přímou (obr. 13) a zpětnou titrací (obr. 12). Celková kyselost byla 4,12 mmol na gram HK. Karboxylátová kyselost byla vypočítána obdobným způsobem. Jedna hodnota byla určena ze spotřeby titračního činidla odpovídajícímu inflexnímu bodu na křivce pH. Druhá hodnota karboxylátové kyselosti odpovídala množství spotřeby titračního činidla v hodnotě pH=9,8. Celková karboxylátová kyselost (obr. 14) byla získána zprůměrováním těchto dvou hodnot. Karboxylátová kyselost se rovná 2,22 mmol na gram HK.

Vypočítaná zdánlivá hodnota pK_a vzorku huminových kyselin určená z Henderson-Hasselbachovy rovnice byla 5,9. Jelikož je $pK_a > 4$, disociace huminových kyselin nastává v zásadité a neutrální oblasti. Huminové kyseliny se podle předpokladů chovají jako slabé kyseliny.

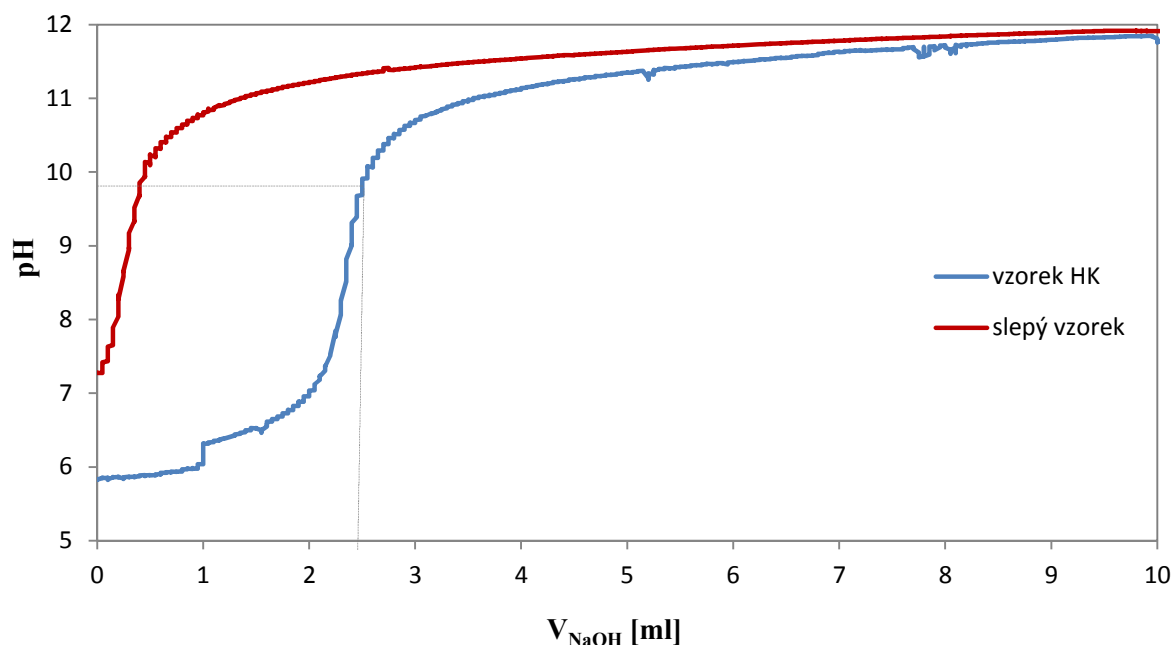
Charakterizace huminových kyselin pomocí titrací a znalost kyselostí huminových kyselin jsou velmi důležitými charakteristikami HK, které významným způsobem ovlivňují reaktivitu HK a jejich interakce s jinými látkami.



Obr. 12 Závislost měrné vodivosti a pH na přidavku HCl při zpětné titraci HK



Obr. 13 Závislost měrné vodivosti a pH na přidavku NaOH při přímé titraci HK



Obr. 14 Závislost pH na přidavku $NaOH$ při karboxylátové titraci HK

FT-IR spektrum obr. 15 odpovídá spektru huminových kyselin, které byly publikovány mnoha předchozími autory.

Ve spektru se potvrdila přítomnost charakteristických skupin pro huminové kyseliny. Těmito skupinami jsou: hydroxylové, karboxylové, fenolové, amidové a karbonylové skupiny.

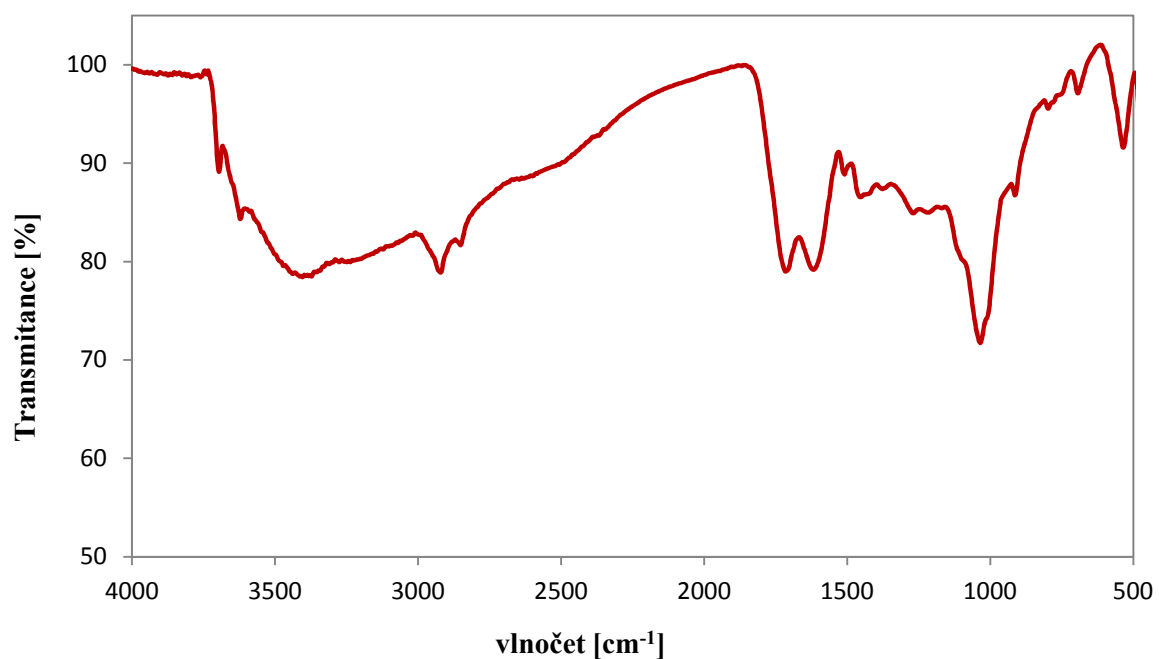
V absorpční oblasti $3\,600\text{--}3\,000\text{ cm}^{-1}$ se nachází široký pás, který odpovídá valenčním vibracím $-OH$ skupin, které jsou svázány vodíkovými vazbami. Tyto $-OH$ skupiny pocházejí především z karboxylových a fenolických skupin. Tento široký difúzní pás je natolik výrazný, což způsobuje překryv některých diagnosticky významných pásů spektra. Právě díky těmto vodíkovým můstkům vytváří makromolekuly huminových kyselin složitou polymerní strukturu. Pro volné $-OH$ skupiny, které nejsou spojeny vodíkovou vazbou, odpovídá ostrý pík při $3\,629\text{ cm}^{-1}$. Volným $-NH_2$ skupinám odpovídá pík při $3\,702\text{ cm}^{-1}$.

Další viditelné pásy v absorpční oblasti $3\,000\text{--}2\,800\text{ cm}^{-1}$ připadají symetrickým a antisymetrickým valenčním vibracím $-CH_2-$ a $-CH_3$ skupin. Tento pás bývá často obtížně rozpoznatelný, jelikož bývá částečně překryt širokým pásem $-OH$ vibrací a jednak z hlediska polymorfního zastoupení uvedených skupin v různých molekulárních formách.

Shluk pásů (dublet) mezi $1\,800\text{--}1\,600\text{ cm}^{-1}$ představuje valenční vibrace karbonylových skupin ($1\,720\text{ cm}^{-1}$), karboxylu a deformační vibrací $-NH_3^+$ skupin ve strukturách aminokyselin. Valenční vibrace $-NH_3^+$ skupin v oblasti $3\,130\text{--}3\,030\text{ cm}^{-1}$ jsou zastíněny jako v předchozím případě širokým difúzním pásem hydroxylových skupin.

V oblasti $1\,450\text{--}1\,350\text{ cm}^{-1}$ jsou spojené valenční vibrace karboxylu s rovinnými deformačními vibracemi $-OH$ karboxylu. V této oblasti se také vyskytují módy aromatických struktur, tyto módy jsou především kruhové nebo polokruhové. Vyskytuje se zde také deštníková vibrace koncových $-CH_3$ skupin. Pás v okolí $1\,200\text{ cm}^{-1}$ je spojován

s deformačními vibracemi fenolických – OH skupin. Znatelně výraznější pás je v okolí $1\,030\text{ cm}^{-1}$ upozorňuje na přítomnost C–O–C vazeb v anhydridech a esterech.



Obr. 15 *FT-IR spektrum huminové kyseliny*

6.2 Optimalizace metody měření na mikrokalořimetru TAM III

Vzhledem k tomu, že nebyly k dispozici podklady z prací jiných autorů, kteří by studovali interakce HK pomocí titrační kalorimetrie, bylo nutné si vhodně navrhnout postup měření, který by byl využitelný v dalším huminovém výzkumu a sloužil by k možnému objasnění vazebných možností huminových kyselin a jejich zabudovávání kovů do složité polymerní struktury těchto makromolekul. Jako hlavní aspekty k navržení vhodného postupu bylo nutné stanovit a vybrat nejvhodnější charakter vzorku - roztok, suspenze, sol. Zjistit optimální koncentraci studovaných vzorků a vhodně navrhnout poměry s koncentracemi titračních roztoků. Dále také bylo nutno optimalizovat množství přídavků a stanovit intervaly mezi jednotlivými přídavky, tak aby reakce při přídavku proběhla a nedocházelo k překrývání jednotlivých píků při titracích.

Tato metoda byla vybrána z hlediska častého využití k charakterizaci mezimolekulárních interakcí a rozpoznávání reakcí, velký vliv na výběr této metody byl i fakt, že není omezena molekulovou hmotností studovaných látek, což by u huminových látek mohl být problém z hlediska jejich složitých polymerních struktur. Z poznatků o titrační kalorimetrii je známo, že metoda není omezena možností studovat jen roztoky, ale lze ji aplikovat také na suspenze, protože zákal nebo zbarvení nemají vliv na měření. Proto bylo jako první postup navrženo měření suspenze huminových látek. Tuto suspenzi lze totiž velmi snadno a rychle připravit.

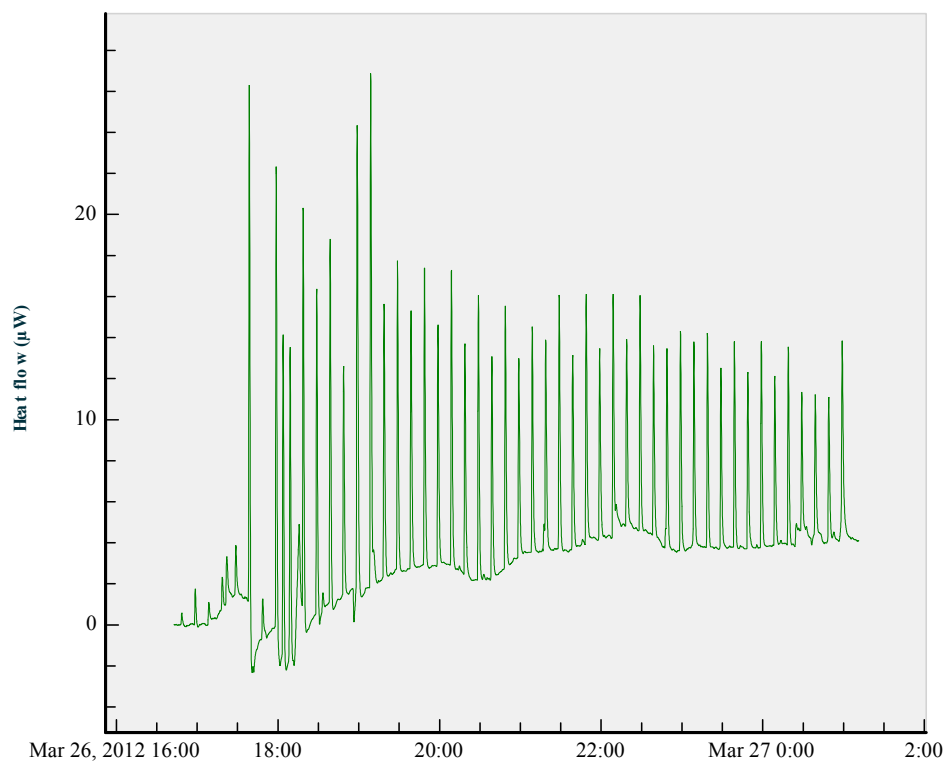
Ad 1)

V tomto postupu byla k titraci vybrána suspenze o koncentraci 20 g/l, tato suspenze byla připravena jako odměrný roztok do odměrné baňky. Do měrné ocelové cely bylo odebráno 1 ml roztoku. Interval mezi přídavky byl nastaven na 10 min (viz postup). Titračními roztoky byly zvoleny 0,1 M CuCl_2 a 0,01 M CuCl_2 .

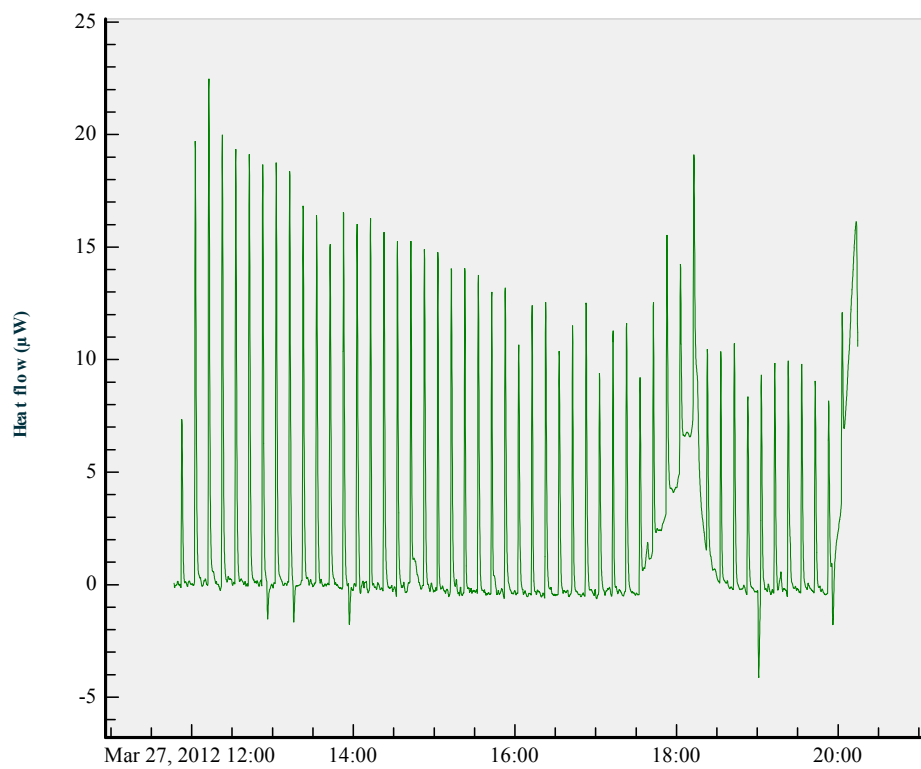
Při těchto měřeních došlo k několika poznatkům, při titraci se nepodařila udržet hladina baseline, baseline měla rostoucí tendenci s přibývajícimi přídavky titračního roztoku. Odezva hodnot tepelného toku se nepohybovala podle očekávání. Nárůst (odpověď) tepelného toku se pohyboval okolo 20 μW , což u tak složitého systému se předpokládala mnohem větší odezva tepelného toku.

Další poznatek se naskytl při měření slepého vzorku. Konkrétně při titrování vody roztokem 0,1 M CuCl_2 . Z toho výsledku se ukázalo, že roztok chloridu měďnatého měl velký význam na samotný průběh reakce s vodou, ale ne už studovaná huminová kyselina, protože se v roztoku slepého vzorku nevyskytovala. Bylo to kontrolní měření, které mělo potvrdit reakci huminových kyselin s mědí, toto tvrzení se nepotvrdilo, jelikož oba dva získané grafy měly podobný prakticky stejný průběh. Baseline zůstávala prakticky stejná, až ke konci titrace se objevil nečekaný vzrůst baseline, odezva tepelného toku se pohybovala také okolo 20 μW jako u měření suspenze. Dva různé výsledky mezi měřeními byly logicky očekávanější než jejich prakticky shodný průběh.

Výsledné grafy z postupu č. 1 přímo odebrané z TAM softwaru jsou uvedeny níže v obrazech. Obrázek č. 16 HK_20 g/l titrována 0,1 M CuCl_2 , obrázek č. 17 voda titrována 0,1 M CuCl_2 . V obou grafech lze pozorovat překryv jednotlivých píků. Mohlo to být způsobeno malým časovým intervalem mezi přídavky titračního roztoku.



Obr. 16 Graf: HK_20 g/l titrována 0,1 M CuCl₂ (software TAM)



Obr. 17 Graf: voda titrována 0,1 M CuCl₂ (software TAM)

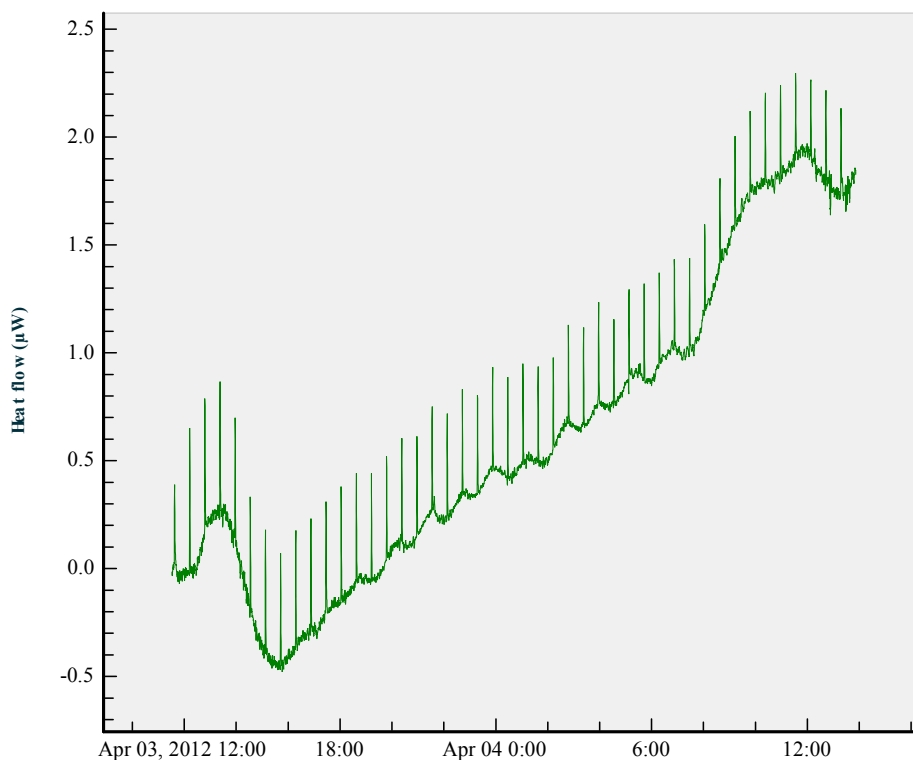
Z výsledků vyplynulo, že při dalším měření by bylo vhodné zvýšit časové intervaly mezi jednotlivými přidavky.

Ad 2)

V tomto postupu byla k titraci opět zvolena suspenze HK o koncentraci 20 g/l, pro porovnání byla připravena suspenze o nižší koncentraci 10 g/l. Byl zvolen interval mezi přidavkem titračního roztoku 35 min, tím se doba měření zvýšila na 24 hod. Z výsledků bylo zjištěno, zda k měřením postačí 8 hod, nebo je nutné mít měření na delší dobu, aby reakce proběhla.

Zvolené koncentrace HK byly titrovány vodou. Tímto kontrolním měřením mělo být prokázáno, že přidavky vody nemají vliv na reakci s huminovými kyselinami a můžeme provádět další měření s reakcemi s kovy.

U obrázku č. 18 můžeme vidět průběh titrace HK vodou.



Obr. 18 Graf: HK o koncentraci 20 g/l titrována vodou (software TAM)

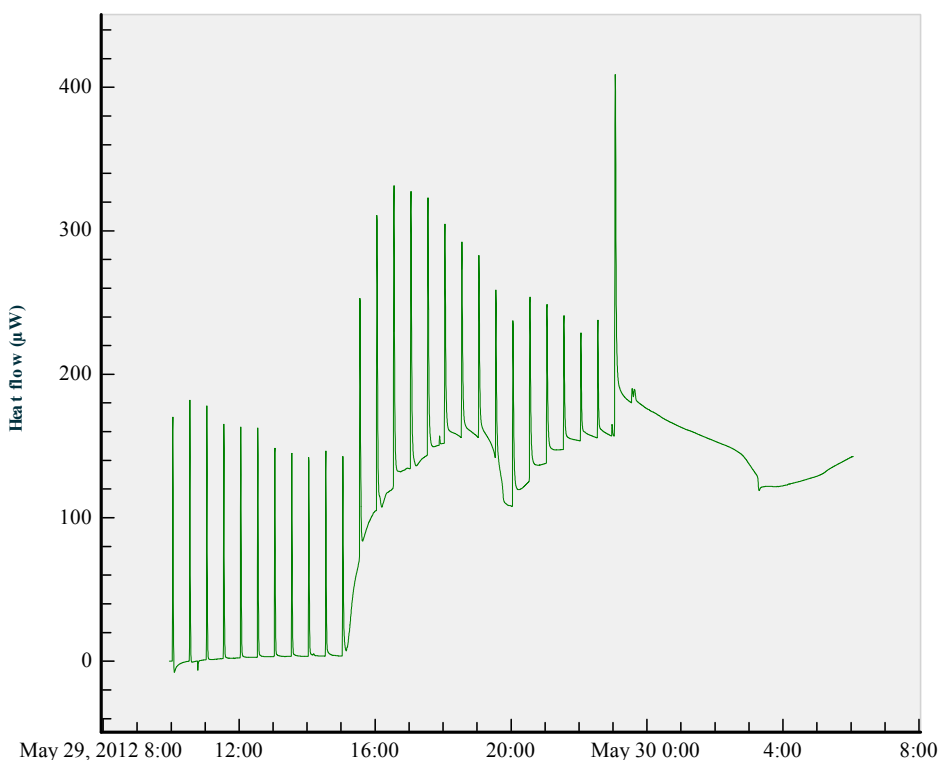
Z výsledků bylo zjištěno, že přidavek vody nemá výrazný vliv na huminové kyseliny. Tento výsledek byl očekáván. Na průběh titrace neměla vliv ani změna koncentrace huminové kyseliny v roztoku. U titrací huminových kyselin o koncentracích 20 g/l, 10 g/l vodou byly odezvy tepelného toku velmi malé, hodnoty se pohybovaly kolem 2 μW , ale opět se baseline neudržela kolem hodnot nuly, rostla směrem nahoru. Po prodloužení intervalů mezi přidavky byla dosažena lepší rozlišitelnost píků.

Z předchozích měření vyplynula pochybnost, že když bylo odebíráno množství 1 ml (popřípadě 800 μ l) z připravené suspenze huminové kyseliny, tak nemohlo být dodrženo přesného odebrání, tak aby v cele byla vždy při každém měření stejná koncentrace huminové kyseliny. Z tohoto důvodu byl navrhnut způsob přípravy suspenze přímo v měrné ocelové cele, dále v diskuzi o postupu č. 3)

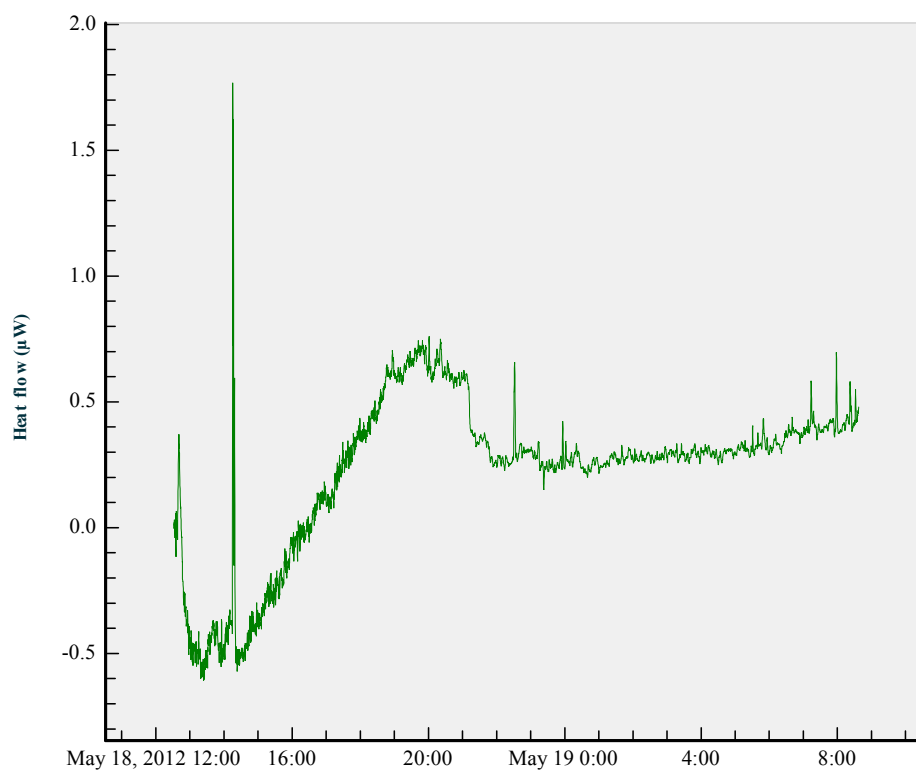
Ad 3)

Aby bylo docíleno přesné koncentrace suspenze huminové kyseliny, byla HK (16 mg) navážena rovnou do měrné ocelové cely, tato navážka odpovídala koncentraci 20 g/l. Kvůli změně přípravy suspenze HK byly opakovány titrace s chloridem měďnatým 0,1 M CuCl_2 . Nebyl už však použit odměrný roztok 0,01 M CuCl_2 , protože nevykazoval žádnou výraznější reakci. Dále byly opakovány titrace s vodou.

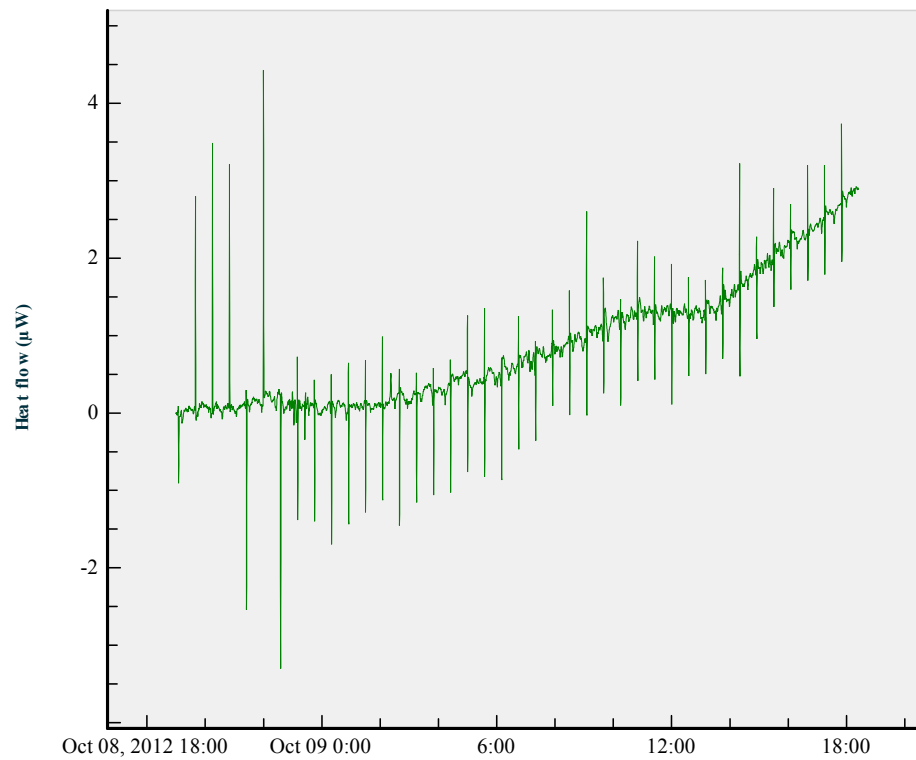
Místo něj byl navrhnut roztok 0,5 M CuCl_2 (obrázek č. 19). Ovšem při této titraci došlo ke korozi ocelové kapiláry 0,5 M CuCl_2 . Kapilára dávkuje přes stříkačku titrační roztok. Situace je zřetelně viditelná na grafu titrace HK 0,5 M chloridem měďnatým. Nebyl přidáván titrační roztok a reakce dále nemohla probíhat. Musela být zakoupena zlatá kapilára, která je odolnější, aby při následujících titracích nenastal stejný problém. Na obrázku č. 20 je zobrazena titrace HK 0,1 M CuCl_2 , tento výsledek potvrdil neprobíhající reakci, která mohla být způsobena špatným výběrem titračního roztoku o nízké koncentraci. Titrace suspenzí HK vodou dopadla stejně jako při předchozím postupu (obrázek č. 21). Dalším problémem při titracích suspenzí mohl být fakt, že huminová kyselina není rozpuštěná, ale jen rozptýlená v roztoku a tím pádem nedochází k požadovanému efektu.



Obr. 19 Graf: HK 20 g/l titrována 0,5 M CuCl_2 (software TAM)



Obr. 20 Graf: HK 20 g/l titrována 0,1 M CuCl_2 (software TAM)



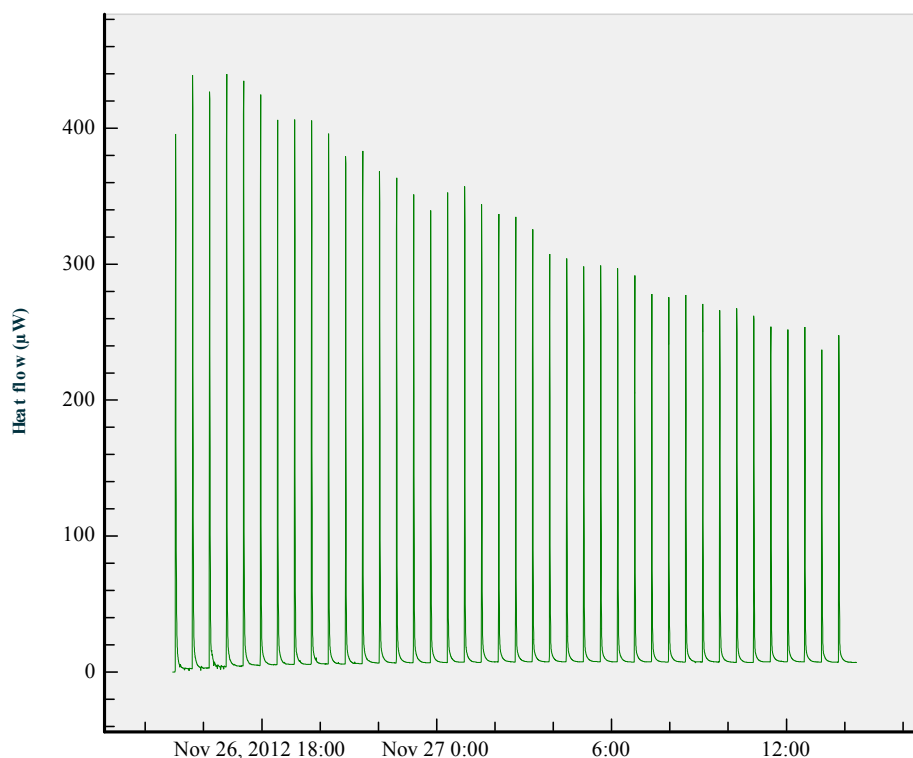
Obr. 21 Graf: opakovaná titrace HK 20 g/l vodou (software TAM)

Ad 4)

Další možností na měření po výsledcích z titrací suspenzí bylo vyzkoušet titraci na solech huminových kyselin. Předpokládalo se, že by mohly být s výraznější odezvou, jelikož huminová kyselina byla rozpuštěna v hydroxidu. Soly byly připraveny podle postupu v kapitole 5.4.2. Vzorku bylo napipetováno 800 μl a titrovalo se čtyřiceti přídávky, celkový objem titračního činidla byl 200 μl . Odezva se pohybovala v řádech stovek μW , což byl mnohem lepší výsledek, než při předchozích měřeních. Příklad uveden na obrázku č. 22

Z grafů bylo možné vyhodnotit, že reakce ještě po 40 přídávkách s časovým intervalem 35 min neproběhla do konce, vypadalo to, že zkoumaná měď ještě neobsadila všechny vazebná místa v huminových kyselinách. Dalším možným důvodem mohl být fakt, že sol obsahoval sodík a v titračním roztoku byl chlorid měďnatý rozpuštěný v dusičnanu draselném, tyto kationty spolu mohly navzájem svádět kompetici na vazebná místa. Jako dalším důvodem zvýšené odezvy mohl být 1 M CuCl_2 . Chlorid jak se ukázalo v předchozích měřeních, způsoboval sám výraznou odezvu tepelného toku už při titraci vody a to měl nižší koncentraci.

Proto bylo navrženo pro další měření změnit poměry mezi vzorkem a titračním roztokem. Nový návrh byl titrovat vzorek o objemu 500 μl titračním roztokem s 50 přídávky, celkovým objemem 250 μl , časový interval ponechán jen na 10 min, jelikož z výsledků měření se dalo usoudit, že 35 min byl moc dlouhý čas a postačil by čas kratší. Další úpravy byly navrženy při přípravě solů. Místo NaOH byl navrhnut KOH, aby nedocházelo ke kompetici kationtů. Bylo navrženo místo vysoce reaktivního roztoku chloridu měďnatého aplikovat roztok dusičnanu měďnatého.



Obr. 22 Graf: sol 1 titrován 1 M CuCl_2 (software TAM)

Na základě předchozí studie bylo dosaženo optimalizovaného postupu k měření isotermické titrační kalorimetrie, aplikovatelného na huminové kyseliny.

Všechny obrázky ze softwaru přístroje TAM III jsou v diplomové práci uvedeny jen jako ukázky výsledků při optimalizaci metody, nebyly z nich počítány celkové energie reakcí, z toho důvodu nebyly převáděny do jiného programu ke zpracování výsledků a k vytváření grafů.

6.3 Optimalizovaný postup aplikovaný na soly HK

V optimalizované přípravě solu byl nahrazen hydroxid sodný hydroxidem draselným, kvůli možné kompetici. Docílili jsme tím, že byla předpokládána jen reakce navazování mědi na vazebná místa huminových látek. U titrací solů titračními roztoky mědi různé koncentrace bylo vidět, že probíhá reakce a pak už se tzv. nic neděje, z těchto měření byly dále počítány hodnoty entalpie pro jednotlivé přídavky titračního roztoku. Ze závislosti entalpie na přídavku mědi bylo v grafu jasně pozorovatelné, kdy došlo k vytitrování a ze zlomu se zjistilo, kolik se mědi navázalo na huminové kyseliny a byla získána reakční entalpie reakce.

Na obrázku č. 23 vidíme průběh titrace solu 1 titračním roztokem 0,5 M $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ – ukázkový výsledek, měření bylo prováděno 2x. Z konečných výsledků byl vytvořen graf závislosti entalpie na přídavku Cu^{2+} . Příklad experimentálních dat získaných pro sol 1 je uveden na obrázku č. 24. V grafu jsou vidět dva zlomy, což znamená, že se celý děj pravděpodobně skládá z více kroků. V první fázi zřejmě dochází hlavně k interakcím měďnatých iontů s kyselými skupinami HK a vytváření inter a intramolekulárních komplexů s vazbou kovu s koordinačním číslem 4. Přebytek měďnatých iontů v poslední fázi titrace pak pravděpodobně způsobí rozrušování těchto struktur a vznik nových vazeb mezi Cu^{2+} ionty a kyselými funkčními skupinami spojených se snížením koordinačního čísla Cu. To je pravděpodobně způsobeno tím, že v tomto případě byl použit roztok 0,5 M $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, čímž bylo dosaženo menších přídavek vzhledem k obsahu HK v solu a tedy „podrobnější titrace“. Při použití 1 M roztoku $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ nebylo možné tyto dva zlomy zachytit, což se potvrdilo i při titracích dalších solů s odpovídajícím poměrem přídavek Cu^{2+} / obsah HK (viz další odstavce).

Ostatní titrace solů byly zpracovány stejným způsobem, jak je popsáno výše. Už se ve výsledcích nevyskytovaly dva zlomy, ale pouze jeden zlom (obrázek č. 25, 26). Soly byly titrovány odpovídajícím poměrem Cu^{2+} , nebylo prováděno zjemnění jak u nejvíce koncentrovaného solu 1. U každé titrace solu byla vypočítána celková reakční entalpie. Podle předem stanovených poměrů koncentrace solů a jejich titračních roztoků, měly být hodnoty entalpií u všech reakcí stejné. Různé koncentrace byly měřeny z důvodu získání výsledků, od kterých by se dalo odrazit pro další měření huminových kyselin pomocí isotermické titrační kalorimetrie. Výsledky potvrdily podobné hodnoty entalpie při navazování mědi. Byly zjištěny poměry navazování mědi na karboxylové a fenolové skupiny v huminových kyselinách. Tyto hodnoty se stejně jako u entalpií lišily jen malým rozdílem. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 8. Zde jsou vypsány hodnoty dvou různých entalpií, které odpovídají dvěma různým zlomům v grafu na obrázku č. 9 solu 1, který byl titrován 0,5 M $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$.

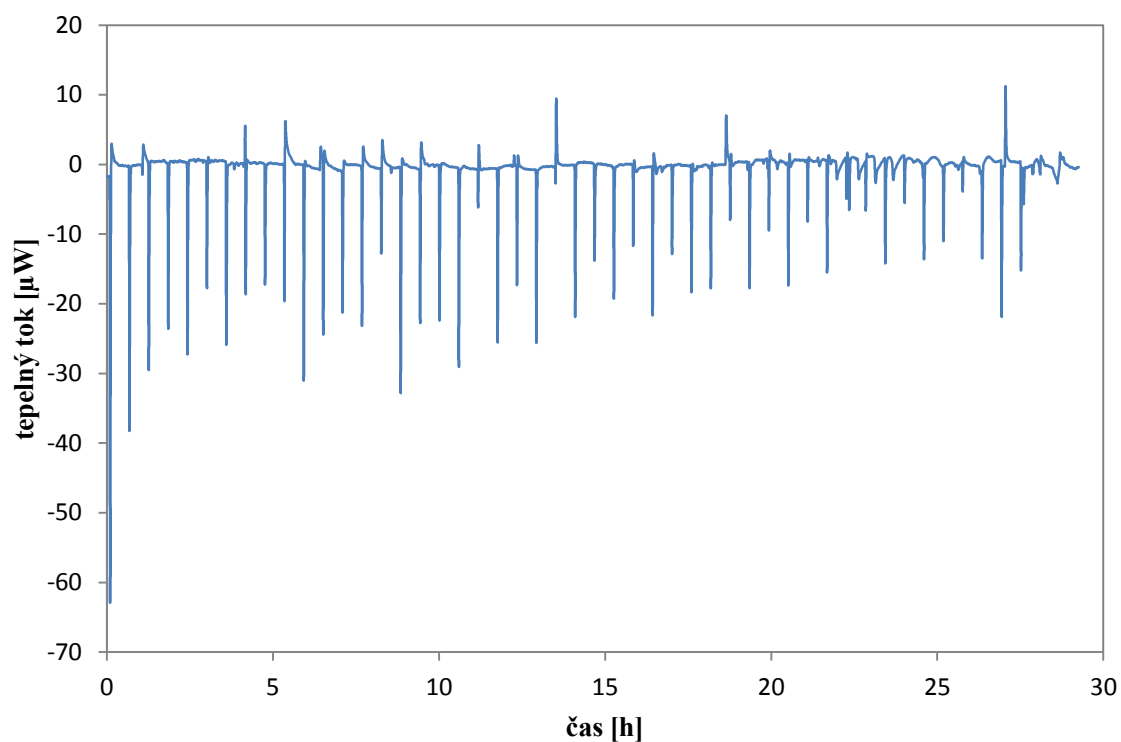
Tabulka 8 *Výsledky titrací solů huminových kyselin*

	Cu (mol/l)	HK (g/l)	Cu/HA (mol/l)	Cu/COOH (mol/l)	ΔH (J/mol)
sol 3	0,1	1	1,4	2,6	-784
sol 2	0,5	10	1,9	3,5	-758
sol 1	1	20	1,7	3,2	-686

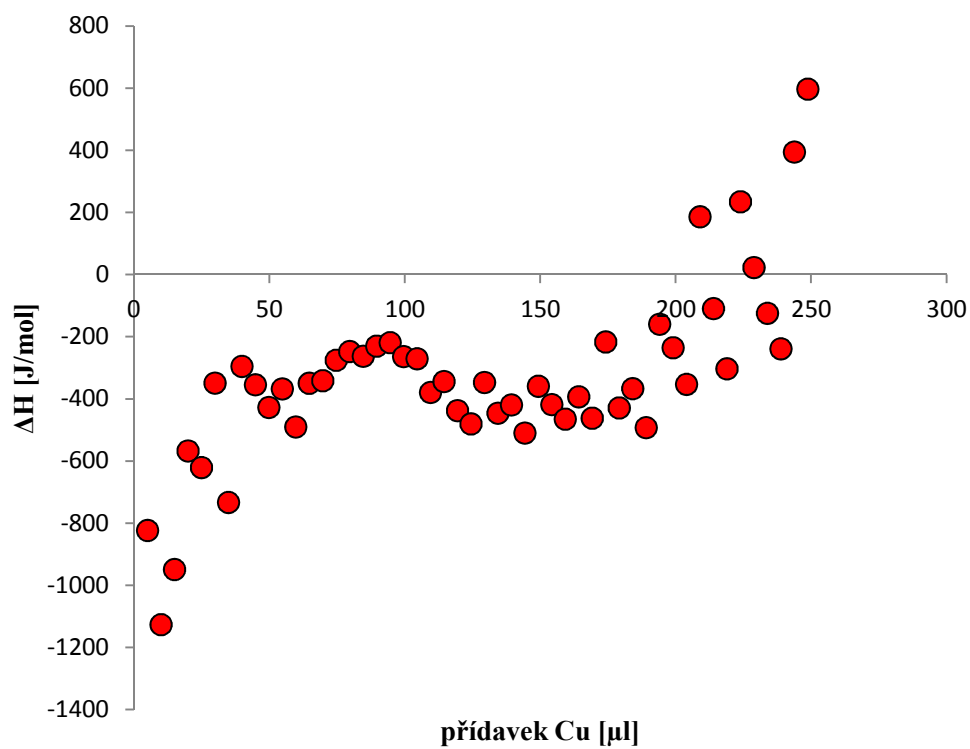
Průměrná ΔH (J/mol)	-743
---	-------------

Tabulka 9 *Výsledky titrace sol 1 huminových kyselin titrován 0,5 M $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$*

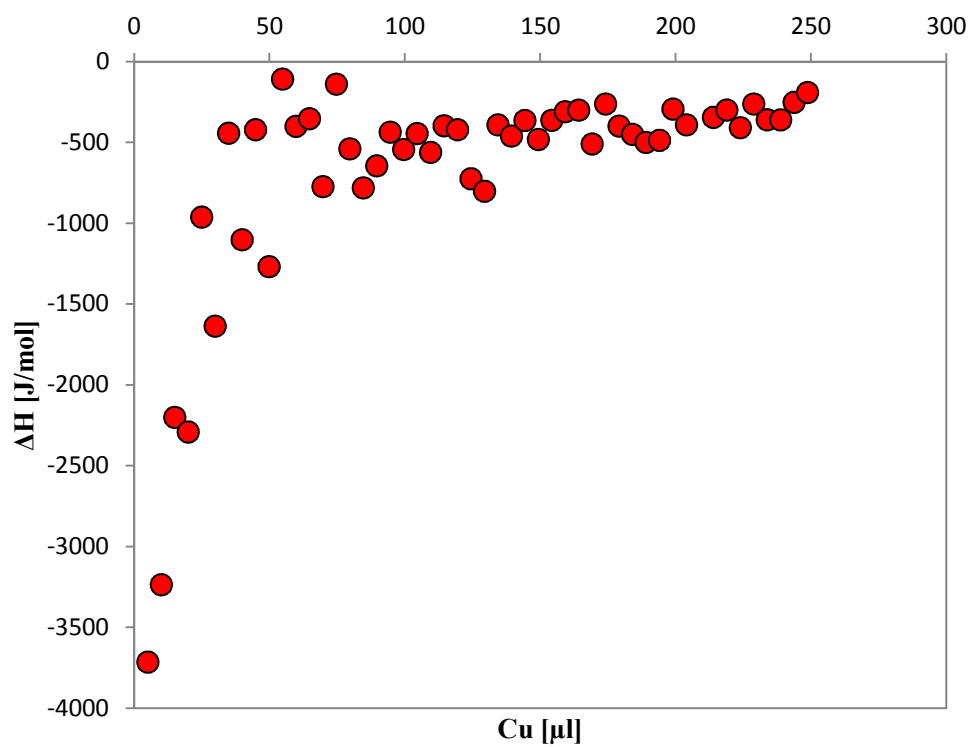
	Cu (mol/l)	HK (g/l)	Cu/HA (mol/l)	Cu/COOH (mol/l)	ΔH (J/mol)
sol 1	0,5	20	1,0	1,9	-715
sol 1	0,5	20	1,9	3,5	-612



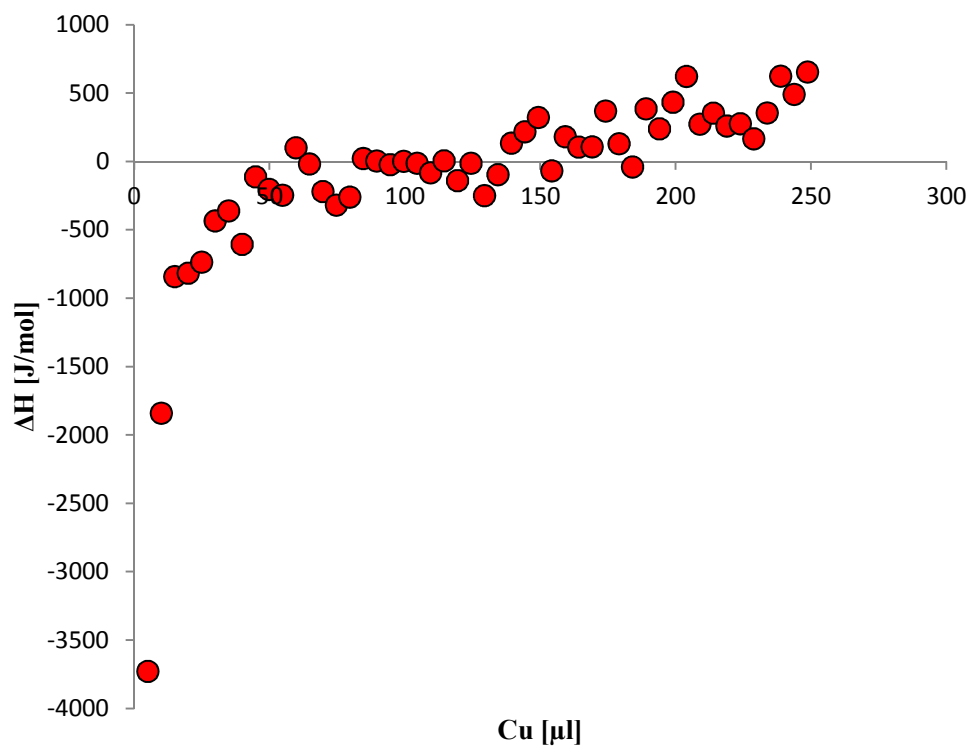
Obr. 23 *Graf: sol 1 titrován 0,5 M $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$*



Obr. 24 sol 1, titrace 0,5 M $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, závislost entalpie na přídavku Cu^{2+}



Obr. 25 sol 2, titrace 0,5 M $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, závislost entalpie na přídavku Cu^2



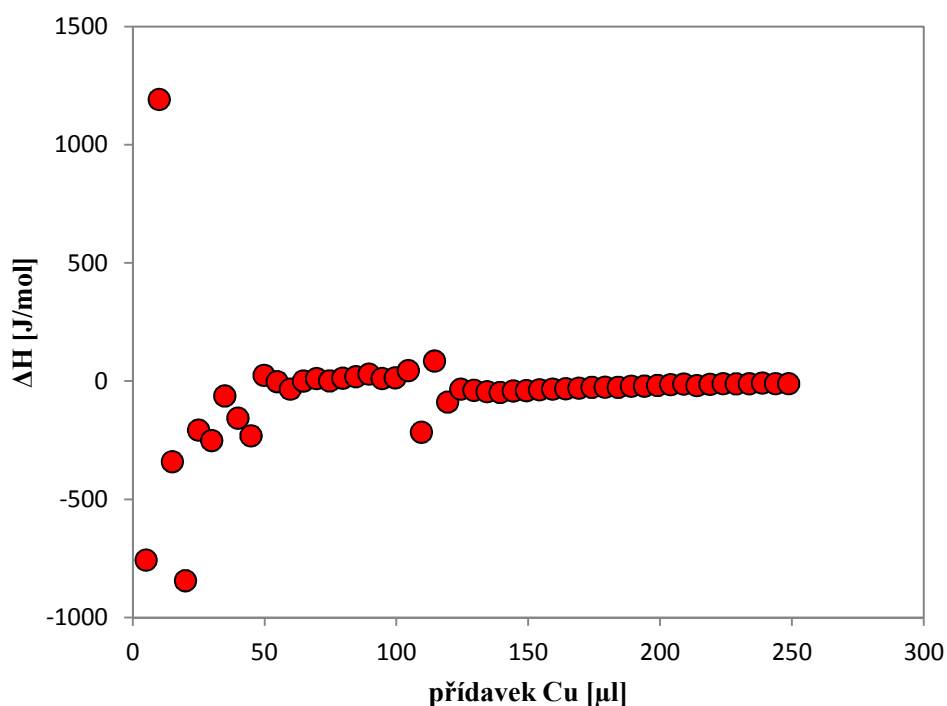
Obr. 26 sol 3, titrace 0,1 M $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, závislost entalpie na přidavku Cu^{2+}

Výpočet reakční entalpie byl počítán podle článků [11, 26]. Tento výpočet byl použit i u modelových sloučenin. Jedná se o semiempirickou metodu INDO molekulových orbitalů parametrizovanou pro sloučeniny přechodných prvků, v našem případě pro měď.

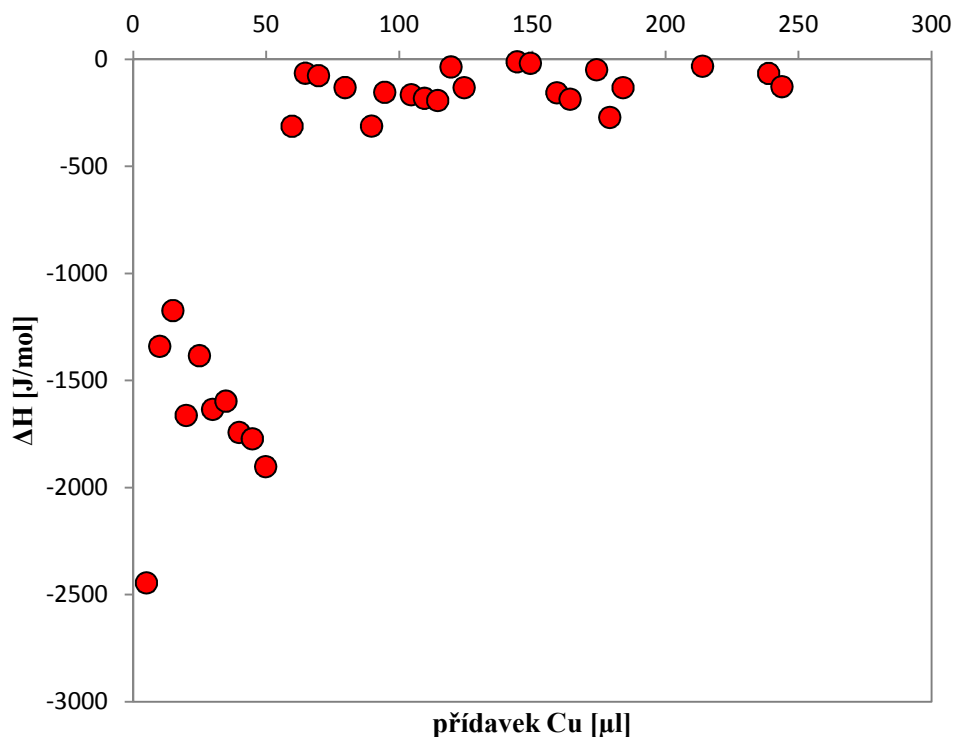
6.4 Optimalizovaný postup aplikovaný na modely HK

Jednoduché organické sloučeniny se využívají k zjištění a popsání interakcí mezi kovy a huminovými látkami, kdy slouží především jako modely hlavních vazebných míst huminových kyselin, které se těchto interakcí účastní. Modely huminových kyselin byly připraveny ve třech koncentracích 20 g/l, 10 g/l, 1 g/l.

Výsledky titrací modelů byly zpracovány stejným způsobem jako soly huminových kyselin. (tabulky č. 10, 11, 12) Byly vypočítány hodnoty reakčních entalpií. Byly vytvořeny grafy závislosti entalpie na přídatku mědi. Výběr z výsledků modelů je na obrázku č. 27, 28. Ve výsledku pyrokatecholu se objevila nejasnost a to ve formě jednoho odloučeného bodu k hodnotě entalpie 1192 J/mol kolem přídatku 10 μ l. Tato nejasnost mohla být způsobena náhlou změnou proudu v přístroji. Ze zlomů v grafech bylo zjištěno, kdy došlo k vytitrování. Výsledné entalpie se ještě navíc porovnávaly s výpočty ze studie [26], kde byly uvedeny vazebné možnosti (modely M1-M10) a vypočítány entalpie pro kyselé a zásadité prostředí. (tabulka č. 13).



Obr. 27 Pyrokatechol jako 20 g/l , závislost entalpie na přídatku Cu^{2+}



Obr. 28 Kyselina ftalová jako 1 g/l , závislost entalpie na přídavku Cu^{2+}

Tabulka 10 Výsledky titrací modelů pro koncentraci 1 g/l

vzorek	Cu (mol/l)	jako HK (g/l)	model	ΔH (J/mol)
benzoová	0,1	1	M9	-91
benzoová	0,1	1	M1	-301
fenol	0,1	1	M10	-105
fenol	0,1	1	M2	-37
ftalová	0,1	1	M7	-1055
ftalová	0,1	1	M4	-589
pyrokatechol	0,1	1	M8	-162
pyrokatechol	0,1	1	M5	-111
salicylová	0,1	1	M6	-1765
salicylová	0,1	1	M6	-1648

Tabulka 11 Výsledky titrací modelů pro koncentraci 10 g/l

vzorek	Cu (mol/l)	jako HK (g/l)	model	ΔH (J/mol)
fenol	0,5	10	M10	-123
fenol	0,5	10	M2	-52
ftalová	0,5	10	M7	-862
ftalová	0,5	10	M4	-304
pyrokatechol	0,5	10	M8	-243
pyrokatechol	0,5	10	M5	-279

Tabulka 12 Výsledky titrací modelů pro koncentraci 20 g/l

vzorek	Cu (mol/l)	jako HK (g/l)	model	ΔH (J/mol)
fenol	1	20	M10	-92
fenol	1	20	M2	-53
pyrokatechol	1	20	M8	-187
pyrokatechol	1	20	M5	-178

Tabulka 13 Reakční entalpie ΔH_r vypočítaná pro Cu – modelové komplexy (^a kyselé prostředí, ^b zásadité prostředí)

vzorec modelu		ΔH_r (J·mol ⁻¹)	vzorec modelu		ΔH_r (J·mol ⁻¹)
M1		-102.73 ^a -1108.26 ^b	M6		-568.73 ^a -3687.62 ^b
M2		-76.12 ^a -987.16 ^b	M7		-512.87 ^a -3208.74 ^b
M3		-322.18 ^a -2124.83 ^b	M8		-309.27 ^a -2328.67 ^b
M4		-301.79 ^a -2002.93 ^b	M9		-162.48 ^a -1462.82 ^b
M5		-168.23 ^a -1512.76 ^b	M10		-101.75 ^a -1259.81 ^b

V tabulce č. 13 jsou uvedeny **modely** těchto **vazebných míst** huminových kyselin:

- Vazba komplexu přechodného prvku na jednu funkční skupinu HL:
 - M1 – funkční skupinou pro vazbu je karboxylátová skupina
 - M2 – funkční skupinou je hydroxylová skupina
- Vazba komplexu přechodného prvku chelátovým způsobem na jeden ligand:
 - M3 – funkčními skupinami ligandu jsou 1-karboxyl, 2-hydroxyl
 - M4 – funkčními skupinami jsou 1, 2-dikarboxyl
 - M5 – funkčními skupinami jsou 1, 2-dihydroxyl
- Vazba komplexu přechodného prvku chelátovým způsobem na dva dvojfunkční ligandy:

- a) M6 – funkčními skupinami obou ligandů jsou 1-karboxyl, 2-hydroxyl
 - b) M7 – funkčními skupinami obou ligandů jsou 1,2-dikarboxyly
 - c) M8 – funkčními skupinami obou ligandů jsou 1,2-dihydroxyly
4. Vazba komplexu přechodného prvku je zabezpečena monodentátním způsobem na dva různé ligandy:
- a) M9 – oba ligandy mají stejnou karboxylovou funkční skupinu
 - b) M10 – oba ligandy mají stejnou hydroxylovou funkční skupinu

Ve výsledcích titrací modelů pro jednotlivé koncentrace je ke každému vzorku přiřazen model z tabulky č. 13. Pro nás byly důležité hodnoty pro kyselé prostředí (horní hodnota označena indexem a), protože měření bylo prováděno v kyselém prostředí. Tyto hodnoty entalpie byly vypočítány pomocí semiempirické metody INDO. Výsledné hodnoty studovaných modelů byly blíže hodnotám v kyselém prostředí podle očekávání. Hodnoty se menším rozdílem lišily, což mohlo být způsobeno tím, že výsledky z předchozí studie byly stanoveny pro systémy v silně kyselém prostředí, v našem případě se hodnoty pH pohybovaly kolem 5, prostředí nebylo silně kyselé, což může být jedním z důvodů.

Byla studována měď jako často využívaný modelový kov. V budoucnu by bylo vhodné zaměřit se na další kovy, což nebylo v rámci práce možné z hlediska dlouho trvající titrace, kdy se jedno měření provádělo 24 hodin a z velmi obtížného optimalizování postupu měření na titračním kalorimetru s využitím na huminové látky.

Měď byla vybrána jako první kov k prostudování na titrační kalorimetrii, protože se často využívá jako tradiční model pro studium interakce kovu s huminovými kyselinami, díky své silné afinitě vazby na vazebná místa huminových kyselin.

7 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá kalorimetrickou studií interakcí huminových látek s vybranými kovovými ionty. Konkrétně s ionty měďnatými Cu^{2+} . Hlavní náplní této práce bylo optimalizovat postup měření isotermické titrační kalorimetrie, tak aby byla použitelná a přínosná pro huminový výzkum v oblasti vazebných interakcí.

Studované huminové kyseliny byly charakterizovány základními metodami. Elementární analýzou bylo zjištěno obvyklé prvkové složení huminových kyselin. FT-IR spektrometrie také potvrdila typické infračervené spektrum pro lignitické huminové kyseliny, publikovány mnoha autory. Potenciometrickou a konduktometrickou titrací byla zjištěna celková kyselost huminových kyselin 4,12 mmol/g HK. Karboxylátová kyselost byla 2,22 mmol/g HK, tyto hodnoty odpovídaly předpokládaným kyselostem huminových kyselin lignitového původu.

Charakterizace huminových kyselin pomocí titrací a znalost kyselostí huminových kyselin jsou velmi důležitými charakteristikami HK, které významným způsobem ovlivňují reaktivitu HK a jejich interakce s jinými látkami.

Optimalizace isotermické titrační kalorimetrie se skládala z vhodného navrhnutí postupu měření: charakteru vzorku, vybrání optimální koncentrace vzorku a titračního činidla, jejich optimálního poměru, vhodně zvolit množství přídavku a stanovit ideální intervaly mezi přídavky. Tato optimalizace se podařila a jako vhodný vzorek pro studium se projevil sol huminové kyseliny. Suspenze byla nevhodná z toho hlediska, že se nedala zaručit vždy stejná koncentrace vzorku při jednotlivých měření. Optimalizovaným postupem byly studovány huminové kyseliny různých koncentrací, jestli vykazují stejnou kalorimetrickou odpověď. Měřením bylo zjištěno, že ΔH u reakcí huminových kyselin s mědí odpovídala přibližně stejným hodnotám, což byl požadovaný výsledek v této první studii isotermické titrační kalorimetrie. Objevila se tím metoda použitelná na prostudování vazebných interakcí huminových látek.

Další měření pomocí optimalizovaného postupu bylo aplikováno na jednoduché organické sloučeniny, které slouží jako modely funkčních skupin HL, které jsou odpovědné za interakce mezi kovem a huminovými látkami. Měření bylo aplikované stejným způsobem jako u solů huminových látek-stejně koncentrace. Výsledné ΔH modelů byly porovnávány se studií, ve které jsou semiempirickou metodou INDO vypočítány ΔH , pro jednotlivá vazebná místa. Výsledky modelů byly přiřazeny k těmto hodnotám. Opět bylo potvrzeno využití této metody, jelikož hodnoty odpovídaly výsledkům v kyselém prostředí.

Tato studie může posloužit jako odrazový můstek k využití isotermické titrační kalorimetrie ke studiu interakcí huminových látek. Vhodné by bylo v této metodě dále pracovat a zjišťovat její další možnosti. Prozkoumat závislosti na pH, teplotě, typech vzorků, přídavků atd. Další postup bych navrhla prostudovat optimalizovaným postupem interakce huminových kyselin s jinými kovy. Celkově se dá říci, že je tato metoda použitelná v huminovém výzkumu.

8 LITERATURA

- [1] Pitter, P.: Hydrochemie. 4th ed. Praha: VŠCHT Praha, 2009. 568 s. ISBN 978-80-7080-701-9.
- [2] WEBER, J.: Definition of soil organic matter, Humintech. [online],[cit. 2013-05-02]. Dostupné z: < <http://www.humintech.com/001/> >.
- [3] Oficiální stránky společnosti Humatex, a.s [online],[cit. 2013-05-02]. Dostupné z: < <http://www.humatex.cz/huminove-latky.html> >.
- [4] TÖLGYESSY, Juraj, et al. Chémia, biológia a toxikológia vody a ovzdušia. Bratislava:VEDA, vydavateľství Slovenské akademie vied, 1984. Humínové látky, s. 99-104. ISBN 80-224-0034-3.
- [5] TÜRKEOVÁ, I. Charakterizace methylovaných huminových kyselin. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 34 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D..
- [6] Stevenson, F. J.: Humus chemistry: Genesis, Composition, Reaction. 2nd edition. New York: Wiley, 1994. 512 p. ISBN 0-471-59474-1.
- [7] Jansen, S. A., Malaty, M. a kol.: Structural modeling in humic acids. *Mat. Sci. Eng. C*, 1996, vol. 4, no. 3, pp. 175 – 179. ISSN 0921-5107.
- [8] Čechová, E.: Chování huminových kyselin ve vodných roztocích. Brno, 2008. Diplomová práce na FCH VUT Brno. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [9] Acidity of humic acid related to its oxygen-containing functional groups. *Bull. of the chem. and tech. of Mac.*, 2006, vol. 25, no. 2, pp. 131 – 137. ISSN 0350-0136.
- [10] DERCOVÁ, K., SKOKANOVÁ, M.: Humínové kyseliny. Interakce humínových kyselin s kontaminantami. *Chemické listy* 2008, 102, str. 338 –345
- [11] KLUČÁKOVÁ, M.; PELIKÁN, P.; LAPČÍK, L.; LAPČÍKOVÁ, B.; KUČERÍK, J.; KALÁB, M.: Structure and Properties of Humic and Fulvic Acids. I. Properties and Reactivity of Humic and Fulvic Acids. *Journal of Polymer Materials*, 2000, vol. 17, no. 4, pp. 337. ISSN: 0970- 0838.
- [12] TERMICKÁ ANALÝZA. Termická analýza. [online]. [cit. 2013-05-02]. Dostupné z: <<http://www.sci.muni.cz/chemsekce/tgir/uloha8.pdf>>.
- [13] WISEMAN T.; WILLISTON S.:Rapid Measurement of binding constants and heats of Binding Usány a New Titration Calorimeter, *Analytical Biochemistry*, 1989, vol. 179, pp. 131–137.

- [14] ÚSTAV FYZIKÁLNÍ CHEMIE VŠCHT. Stanovení termodynamických dat pomocí titrační kalorimetrie. [online]. [cit. 2013-05-02]. Dostupné z: <<http://www.vscht.cz/fch/cz/vyuka/ITC.pdf>>.
- [15] VŠCHT PRAHA. Infračervená spektrometrie.[online], [cit. 2012-05-02]. Dostupné z: <<http://lms.vscht.cz/Zverze/Infrared.htm#Techniky>>.
- [16] BOEHM S., Voltrová, S.: Strukturní analýza organických sloučenin. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995. 152 s. ISBN 80-708-0235-9.
- [17] GOSTISHCHEVA M. V., BELOUSOV V.: Comparative IR spectral characteristics of humic acids from peats of different origin in the tomsk area. *Phar. Chem. Journal*. 2009, vol. 43, no. 7, pp. 44 – 47. ISSN 1573-9031.
- [18] KLOUDA, P. Moderní analytické metody. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2, s. 31–122.
- [19] KHOPKAR, S.M.: *Basic concepts of analytical chemistry*. 2nd edition, New age international, 1998, p. 500.
- [20] BARTUŠEK, M.: *Úvod do elektroanalytických metod*. 1. vyd. Praha: SPN, 1984, 104 s.
- [21] BOUCHEMAL, K.. New challenges for pharmaceutical formulations and drug delivery systems characterization using isothermal titration calorimetry. *DrugDiscovery Today*. 2008, vol. 13, no. 21–22, p. 960–972. ISSN 13596446.
- [22] NUNEZ, S.; VENHORST, J.; KRUSE, C. G. Target–drug interactions: First principles and their application to drug discovery. *Drug Discov. oday* 2012, vol. 17, p. 10–22.
- [23] PEROZZO, R.; FOLKERS, G.; SCAPOZZA, L. Thermodynamics of protein–ligand interactions: History, presence, and future aspects. *J. Recept. Sig. Transd.* 2004, vol. 24, p. 1–52.
- [24] HOLDGATE, G. A.; WARD, W. H. J. Measurement of binding thermodynamics in drug discovery. *Drug Discov. Today* 2005, vol. 22, p. 1543–1550.
- [25] TOSSELL, J.A.: Quinone-hydroquinone complexes as model components of humic acids: Theoretical studies of their structure, stability and Visible-UV spectra, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2009, vol. 73, pp. 2023-2033. ISSN 0016-7037.
- [26] KLUČÁKOVÁ, M.: Comparative Study of Binding Behaviour of Cu(II) with Humic Acid and Simple Organic Compounds by Ultrasound Spectrometry. *The Open Colloid Science Journal*, 2011, vol. 5, no. 1, pp. 5-12. ISSN: 1876- 5300.

- [27] ANTONELLI, M.L.; CALACE, N.; FORTINI, C., et.al.: Calorimetric envestigation of komplex formation of some humic compounds. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2002, vol. 70, no. 1, pp. 291-297. ISSN: 1572-8943.
- [28] PRADO, G.S. ALEXANDRE; AIROLDI, C.: Humic acid-divalent cation interactions. *Thermochimica Acta*, 2003, vol. 405, no. 2, pp. 287-292.
- [29] KINNIBURGH, D.G.; RIENSDIJK, W.H.; et. al.: *Colloids Surf.*, 1999, vol. 151, pp.147.
- [30] BRYAN, N.D.; ROBINSON, V.J.; et. al.: Metal-humic interactions: A random structural modeling approach. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1997, vol. 61, no. 4, pp. 805-820.
- [31] BRYAN, N.D.; HESKETH, N.; et. al.: Metal ion-humic substance interaction. A thermodynamic study, 1998, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, vol. 94, pp. 95-100.
- [32] TAN, W.F.; KOOPAL L.K.; NORDE, W.; Interaction between humic acid and lysozyme, studied by dynamic light scattering and isothermal titration calorimetry, 2009, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, no. 3, pp. 591-596.
- [33] MACHESKY, M.L.: Calorimetric acid-base titrations of aquatic and peat-derived fulvic and humic acids, 1993, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 27, pp. 1182-1189.
- [34] KLUČÁKOVÁ M.; PEKAŘ M.: New Model for Equilibrium Sorption of Metal Ions on Solid Humic Acids. *Colloids and Surfaces, A: Physiochemical and Engineering Aspects* 2006, vol. 286, no. 1-3, p. 126-133. ISSN 0927-7757.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

HL	humínové látky
HK	humínové kyseliny
FK	fulvínové kyseliny
ITC	isothermal titration kalorimetrie, isotermická titrační kalorimetrie
TAM	thermal activity monitor
UV-VIS	ultrafialová a viditelná spektrometrie
NIR	near-infrared spektrometrie, blízká infračervená spektrometrie
IR	infračervená spektrometrie
EPR	electron paramagnetic resonance
FT-IR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
T	Transmittance
A	Absorbance
ΔG	volná Gibbsova energie
ΔS	změny Entropie
V	objem
H	entalpie
ΔH	reakční entalpie
K	vazebná konstanta

10 SEZNAM PŘÍLOH

- PŘÍLOHA 1 mikrokolorimetr TAM III (TA Instruments, USA)

PŘÍLOHA 1

